COUNTWAY LIBRARY
HC 6EBI

BOSTON
MEDICAL LIBRARY
8 THE FENWAY

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. F. BÜCHNER
PROFESSOR DER PATHOLOGIE
FREIBURG i. Br.

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. O. RIESSER †
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT a. M.

207. BAND

MIT 212 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1949

CATALOGUED
FEB 1 1950
E. S.

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.

BOSTON
FEB 7 1950
MEDICAL LIBRARY

Inhalt des 207. Bandes.

Seite

Alslev, Jens, und **Manfred Kiese,** Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen. IV. Mitteilung. Kristalliner $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester. Mit 5 Textabbildungen 525

Amelung, Diethard, s. **Fritz Heim.**

Bagdy, D., s. **E. Varga** und **L. Kesztyüs.**

Bayerle, Hans, und **Rudolf Marx,** Über die Einwirkung von Magen-Darm-Fermenten auf Gewebsthrombokinase 8

Becker, Volker, Über eine Methode der qualitativen Bestimmung von Giftwirkungen auf Fermentsysteme der Zellatmung. Mit 1 Textabbildung 109

Biehler, Wilhelm, und **G. Hanisch†,** Tierexperimentelle Untersuchungen mit einem Strychnindepotpräparat. Mit 4 Textabbildungen 688

Blaich, Wilhelm, Über den Einfluß von Penicillin auf den Arbeitsrhythmus des Mäusepankreas. Mit 3 Textabbildungen. 90

Böhm, Kurt, s. **Fritz Jung.**

Boenecke, Ilse, s. **Karl-Heinz Schäfer.**

Bublitz, Hans-Robert, s. **Franz X. Hausberger.**

Collischonn, P., s. **F. Eichholtz, R. Hotovy** und **H. Knauer.**

Dupont, W., s. **G. Kuschinsky** und **R. Hennes.**

Eckart, Alfred, Die Nervenbahn als Trägerin der DDT-Vergiftung. . . . 334

Eichholtz, F., R. Hotovy, P. Collischonn und **H. Knauer,** Beeinflussung der Entgiftungszeiten von Avertin und Pentothal-Natrium an der nebennierenlosen Ratte durch Nebennieren-Rindenhormon (Pentothal-Natrium-test). Mit 3 Textabbildungen 576

Fleckenstein, Albrecht, s. **Annemarie Hardt.**

Füzes, E., s. **E. Varga** und **L. Kesztyüs.**

Gatzek, H., und **K. Mechelke,** Testung der Antihistaminika Antistin, Neoantergan, Pyribenzamin und Synopen gegenüber der Histaminkreislaufwirkung mit fortlaufend registrierenden Methoden am gesunden Menschen. Mit 4 Textabbildungen 711

— **K. Matthes** und **K. Mechelke,** Untersuchungen über das Wirkungsbild der Mutterkornalkaloide Ergotamin, Dihydroergotamin und Dihydroergocornin am gesunden Menschen. Mit 4 Textabbildungen . . . 720

Gerlich, Norbert, Experimentelle Studien über die Beziehungen zwischen Schilddrüse und Krampfbereitschaft. Mit 7 Textabbildungen 159

— Die experimentelle Bestimmung der gegen Krämpfe gerichteten Wirkung von Arzneistoffen mit Hilfe der Elektrokrampfmethode. Mit 6 Textabbildungen 294

Glabasnia, Günter, s. **Franz X. Hausberger.**

Hanisch, G.†, s. **Wilhelm Biehler.**

Hardt, Annemarie, und **Albrecht Fleckenstein,** Über die Kaliumabgabe des Froschmuskels bei Einwirkung kontrakturerzeugender Stoffe und die Hemmung der Kaliumabgabe durch kontrakturverhütende Lokalanästhetika. Mit 3 Textabbildungen 39

Seite

Hausberger, Franz X., und **Hans-Robert Bublitz,** Der Einfluß des Hungers und des Insulinmangels auf den Lipasegehalt der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes von Ratten. Mit 1 Textabbildung 418
—, und **Günter Glabasnia,** Die Glykogenablagerung in Leber, Muskel und Fettgewebe hungernder Ratten nach Glukosefütterung 409
—, und **Orest Jachtorowycz,** Der Einfluß verschiedener Ernährungszustände auf die Glykogenbildung im überlebenden Zwerchfell- und Fettgewebe der Ratte. Mit 1 Textabbildung 71
Heim, Fritz, und **Diethard Amelung,** Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Cholinesterase hemmender Wirkung. Mit 6 Textabbildungen 477
—, und **R. Reim,** Die Wirkung des Xanthins und mehrerer methylierter Xanthinderivate auf die Aktivität der spezifischen Cholinesterase und Aminoxydase. Mit 5 Textabbildungen 703
Hennes, R., s. **G. Kuschinsky** und **W. Dupont.**
Heubner, Wolfgang, und **Hildegard Weist,** Über intrazelluläre Verschiebung der Wasserstoffzahl. Studien über Methämoglobinbildung. XXXI. Mitteilung. Mit 10 Textabbildungen 324
Hohensee, Friedrich, und **Ludwig Lendle,** Über die Frage einer Vaguswirkung von Digitalisglykosiden. Mit 5 Textabbildungen 388
Hotovy, Rudolf, Über die Filtration und Wassersekretion in der Froschniere 586
— s. **F. Eichholtz, P. Collischonn** und **H. Knauer.**
Jachtorowycz, Orest, s. **Franz X. Hausberger.**
Jung, Fritz, und **Kurt Böhm,** Über die Saponinhämolyse. Mit 6 Textabbildungen 144
— **Friedrich,** s. **Margot Lorenz.**
Kadatz, Rudolf, Über die Wirkung neuer Adrenalinderivate auf die kleinsten oberflächlichen Hautgefäße des Menschen 363
Kalow, Werner, Letalitätsbestimmungen und Variation. Mit 3 Textabbildungen 301
—, Cholerese durch synthetische Mittel. III. Mitteilung. Wirkung und chemische Konstitution einiger Phenylkarbinol- und Phenylglykolverbindungen 696
Kesztyüs, L., s. **E. Varga** und **D. Bagdy.**
— s. **E. Varga** und **E. Füzes.**
Kiese, Manfred, Die Reduktion des Hämoglobins. VI. Mitteilung. Die von reversibel reduzierbaren Farbstoffen katalysierte Reduktion 99
— Zur Toxicität neuer Süßstoffe (1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzole). Mit 2 Textabbildungen 446
— s. **Jens Alslev.**
—, und **Georg Klingmüller,** Die Sauerstoffbindung partiell oxydierten Blutfarbstoffs. Mit 5 Textabbildungen 655
—, und **Maria Soetbeer,** Kinetik der Hämiglobinbildung. II. Mitteilung. Hämiglobinbildung durch Nitrit in vivo. Mit 6 Textabbildungen . . 437
—, — Kinetik der Hämiglobinbildung. I. Mitteilung. Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin in vivo. Mit 7 Textabbildungen 426
Kleiss, Ekkehard, Zur Frage der Vitalfärbung mit Prontosil. Mit 10 Textabbildungen 14
Klingmüller, Georg, s. **Manfred Kiese.**
Knauer, H., s. **F. Eichholtz, R. Hotovy** und **P. Collischonn.**

Seite

Kopf, Rudolf, Arnold Loeser, Gerda Meyer, gemeinsam mit **Hans-Joachim Bielig,** Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Thiouracilen und Amino-thiouracilen auf Stoffwechsel und Organe. Mit 7 Textabbildungen 256

Kroneberg, Günther, und **Hans Ocklitz,** Adrenalindiurese und Kochsalzausscheidung. Mit 4 Textabbildungen 491

—, **Hans-Joachim Schümann** und **Wolfgang Ocklitz,** Über den Hypertensinogengehalt des Blutes bei eiweißarmer Ernährung. (Eiweißmangel und Hypotonie.) Mit 7 Textabbildungen 352

Kuschinsky, G., W. Dupont und **R. Hennes,** Über den Einfluß des Rutins auf die Permeabilität der Gefäße. Mit 2 Textabbildungen 138

Laubender, Walther, Werner Lipschitz † 243

Lendle, Ludwig, s. **Friedrich Hohensee.**

Letterer, Erich, Versuche über Bedeutung des Vitamin A für Entstehung und Verhütung der Amyloidose. (Zugleich ein Beitrag zur Pathologie des Vitamin A.) Mit 8 Textabbildungen 500

Lindemann, Bruno, Über die Natur der sog. Cabotschen Ringkörper der Erythrozyten. Mit 4 Textabbildungen 67

— Der hämolytische Ikterus als Strukturproblem. Ein elektronenmikroskopischer Beitrag zur Pathogenese der angeborenen hämolytischen Anämie. Mit 5 Textabbildungen 569

Loeser, Arnold, s. **Rudolf Kopf, Gerda Meyer** gemeinsam mit **Hans-Joachim Bielig.**

Lorenz, Margot, und **Friedrich Jung,** Über die Cholinesterase des Froschherzens. VI. Mitteilung. Zum Wirkungsmechanismus cholinergischer Stoffe. Mit 5 Textabbildungen 372

Marx, Rudolf, s. **Hans Bayerle.**

Matthes, K., s. **H. Gatzek** und **K. Mechelke.**

Mechelke, K., s. **H. Gatzek.**

— s. **H. Gatzek** und **K. Matthes.**

Meiler, Günther, s. **Karl Zipf.**

Meyer, Gerda, s. **Rudolf Kopf, Arnold Loeser** gemeinsam mit **Hans-Joachim Bielig.**

Nacke, Otto, und **Marianne Weber,** Über den Einfluß des Sulfonamidpräparates Supronal auf das nichtinfektiöse Fieber der Maus. Mit 2 Textabbildungen 1

— — Über die Wirkung des Sulfathioharnstoffs (Badional) auf das nichtinfektiöse Fieber der Maus. Mit 2 Textabbildungen 5

Ocklitz, Hans, s. **Günther Kroneberg.**

— s. **Günther Kroneberg** und **Hans-Joachim Schümann.**

Pirwitz, Joachim, Über die O_2-Atmung menschlichen Knochenmarks, Blutes und Serums. Mit 6 Textabbildungen 594

Pohle, Konrad, und **Hubert Went,** Über die Ausscheidung des Pyramidons im Harn. Mit 3 Textabbildungen 203

Poos, Fritz, Reizungskondition und Irritabilität (Pseudosensibilisierung) bei der pharmakologischen Beeinflussung von Einzelfunktionen der Organe. (Nach experimentellen und klinischen Untersuchungsergebnissen am Auge.) Mit 5 Textabbildungen 115

Reim, R., s. **Fritz Heim.**

Schaefer, Heinz, Zur Frage der Leberschädigung durch Chemotherapeutika 134

Schäfer, Karl-Heinz, und **Ilse Boenecke,** Die neurovegetative Lenkung des Eisenstoffwechsels. Mit 7 Textabbildungen 666

Seite

Schettler, Gotthart, Studien zum Cholesterinstoffwechsel der Maus. III. Mitteilung. Untersuchungen über Cholesterinmast. Mit 2 Textabbildungen 380
Schroeder, Wilhelm, Leopold Ther und **Karl Wezler,** Zur Frage der Adrenalinumkehr durch Sekalealkaloide. Mit 7 Textabbildungen 468
Schümann, Hans Joachim, s. **Günther Kroneberg** und **Wolfgang Ocklitz.**
Schümmelfeder, Norbert, „Polypeptid-" und Reststickstoff des Blutserums im experimentellen Verbrennungsschock. Mit 7 Textabbildungen . . . 82
Schultze, Herm. E., Theoretische und experimentelle Grundlagen der Prothrombinbestimmung unter Berücksichtigung des Prothrombin-Accelerators. Mit 1 Textabbildung 173
Schwarz, Friedrich, Über die Wirkung kontaktinsektizider Stoffe auf das Zentralnervensystem einiger Kaltblüter. Mit 3 Textabbildungen . . . 609
Seel, Hans, Beiträge zur Toxikologie einiger Schädlingsbekämpfungsmittel aus der Gruppe aromatischer Nitroverbindungen 625
Soetbeer, Maria, s. **Manfred Kiese.**
Stephan, Georg, s. **Hans Friedrich Zipf.**
Ther, Leopold, s. **Wilhelm Schroeder** und **Karl Wezler.**
Varga, E., D. Bagdy und **L. Kesztyüs,** Die „cortinähnliche" Wirkung des g-Strophanthins. I. Mitteilung 29
— **E. Füzes** und **L. Kesztyüs,** Die „cortinähnliche" Wirkung des g-Strophanthins. II. Mitteilung 213
Weber, Marianne, s. **Otto Nacke.**
Weist, Hildegard, s. **Wolfgang Heubner.**
Went, Hubert, s. **Konrad Pohle.**
Wezler, Karl, s. **Wilhelm Schroeder** und **Leopold Ther.**
Widmann, Helmut, Tierexperimentelle Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Colchicins in letalen und subletalen Dosen auf Blut und Knochenmark. Mit 7 Textabbildungen 218
Wirth, Wolfgang, Zur Pharmakologie der Phosphorsäureester. Diäthyl-p-nitrophenylphosphat („Mintacol"). Mit 6 Textabbildungen 547
Zipf, Hans Friedrich, Über die stabilisierende Wirkung von Borationen auf biologisch wirksame Brenzkatechinderivate. Mit 3 Textabbildungen . . 540
—, und **Georg Stephan,** Untersuchungen über die Wirkung von Borsäure und von Mischungen der Borsäure mit aliphatischen Polyoxyverbindungen. Mit 1 Textabbildung 55
— **Karl,** und **Günter Meiler,** Zur Wirkung des Bromcholins 459

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 1—4 (1949).

Aus der Universitäts-Frauenklinik Münster i. Westf.
(Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach).

Über den Einfluß des Sulfonamidpräparates Supronal* auf das nichtinfektiöse Fieber der Maus.

Von

Otto Nacke und Marianne Weber.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. September 1948.)

Die schnelle Entfieberung durch Verabreichung von Supronal (W. Bickenbach und K. Knörr[1], L. Heilmeyer und W. Keiderling[2]) bei Infektionen der verschiedensten Art wirft die Frage auf, ob der Temperaturabfall die Überwindung der Infektion anzeigt oder ob er durch einen direkten Einfluß des Heilmittels auf die Wärmeregulation hervorgerufen wird, die Infektion aber weitergeht.

Der Einfluß einiger älterer Sulfonamide auf die Wärmeregulation ist bekannt. Klinische Beobachtungen brachten Löffler und Hegglin[3] zu der Annahme einer antipyretischen Wirkung des *Sulfapyridin* (Sulfapyridin „Bayer", Sulfapyridin „Homburg", Eubasinum). Nicolai[4] und Brandis[5] fanden beim Pyriferfieber des Menschen einen geringeren Fieberanstieg und eine kürzere Fieberdauer als in Pyrifervergleichsreihen ohne Sulfapyridin. Auch bei Kaninchen und Ratten wurde eine Temperatursenkung durch Sulfapyridin beobachtet (Konzett und v. Warsberg[6]). *Acetylsulfapyridin* und *Acetylsulfathiazol* wirken ebenfalls antipyretisch (Beeson und Janeway[7], Knoppers[8]). *Paraaminophenylsulfamid* (Streptosil) hat beim Meerschweinchen einen geringen Temperaturanstieg mit nachfolgender, langdauernder leichter Temperatursenkung zur Folge (Savoretti[9]). Auf Grund klinischer Beobachtungen nahm Kramer[10] auch für das *Sulfathiazol* (Cibazol, Eleudron) eine temperatursenkende Wirkung an. Löffler und Hegglin und Nicolai[11] stellten jedoch beim Pyriferfieber des Menschen keinen deutlichen Einfluß fest. Das Wärmestichfieber bei Kaninchen und Ratten wird durch Sulfathiazol aber gesenkt (Beeson und Janeway, Konzett und v. Warsberg). Doch wurden auch plötzliche Temperaturanstiege beobachtet (Moe chlin[12] und Mischer[13]). Die Wirkung des Sulfathiazol auf die Wärmeregulation ist also verschieden.

Entsprechende Versuche mit *Prontosil* (Unshelm und Hofmann[14], Konzett und v. Warsberg) zeigten, daß der Temperaturverlauf durch diese Mittel nicht beeinflußt wird. Nur vereinzelt werden Reaktionen nach Art eines Arzneimittelfiebers beobachtet (Ringl[15], Högler und Loibl[16]). Keinen Einfluß auf die Körpertemperatur haben: *Sulfanilamid* (Prontalbin, Prontosil album, Gombardol usw.) (Konzett und v. Warsberg), *p-Aminobenzolsulfonamidoäthylthiodiozol* (Globucid) (Sapinsky[17]) und *Aminomethylphenylsulfonamid* (Marfanil) (Konzett und v. Warsberg).

* Chemische Bestandteile: 2-(p-Aminobenzolsulfonamido)-4-Methylpyrimidin und Sulfathioharnstoffsalz des 4-Aminomethylbenzolsulfonamid zu gleichen Teilen.

Um die Frage nach der Wirkung des *Supronal* auf die Wärmeregulation zu beantworten, wurde zunächst von dem einen von uns eine neue Methode* der Temperaturmessung am Kleintier entwickelt. Dies erwies sich als notwendig, da auf Grund eigener Erfahrungen durch die geringe Genauigkeit der älteren Verfahren Zufallsergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnten. Mit der neuen Technik läßt sich der Mittelwert der Rektaltemperatur einer Versuchsgruppe von 15 Mäusen über 10 Stunden mit einer Höchstschwankung von nur

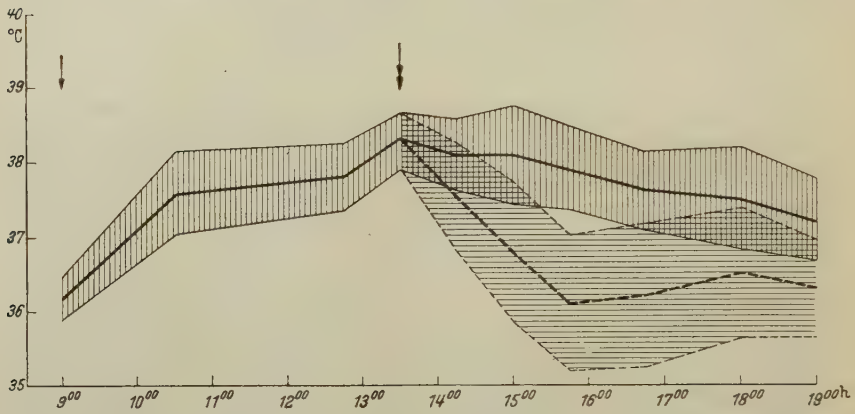


Abb. 1. Wirkung des Supronal auf das Wärmestichfieber der Maus. Mittelwert der Rektaltemperatur von 21 Mäusen. Bei ↓ Fieberstrich, bei ↓ 0,02 g Supronal subkutan. ——— Kontrollmäuse, - - - - - Mäuse mit Supronal. Der dreifache mittlere Fehler ist durch Schraffierung dargestellt.

$\pm$ 0,05° C konstant halten. Bei Fieberversuchen mit 100 Einheiten Pyrifer je Maus differierte die Dauer des Fiebers bei 5 Versuchsgruppen nur um 3% der Gesamtdauer.

Versuchsanordnung.

Männliche weiße Mäuse von durchschnittlich 25 g Gewicht wurden in einem Thermostaten bei 23° C gehalten. Die Temperatur wurde $^1/_2$stündlich rektal in einer Körpertiefe von 11 mm thermoelektrisch gemessen, wobei die Tiere im Thermostaten verblieben. Die Einstellzeit der Meßeinrichtung betrug 1,4 Sek. Der ganze Meßvorgang benötigte etwa 10 Sek. je Tier. Aus den Ergebnissen der einzelnen Messungen wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt und in den Kurven dargestellt. Der dreifache mittlere Fehler wurde durch Schraffierung der Flächen gekennzeichnet.

Im ersten Versuch (s. Abb. 1) wurde bei 21 Mäusen eine Temperatursteigerung durch Fieberstich in Äthernarkose erzeugt. Zu

* Die Methode wird von Nacke noch an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden.

diesem Zwecke stachen wir 3 mm unterhalb der Mitte zwischen beiden Ohren bis zur Schädelbasis mit der Kanüle ein. Dann wurden 0,01 cm³ 1,5%iger Lösung von Tetrahydrobetanaphtylamin intrazerebral injiziert. Wir gaben das Tetrahydrobetanaphtylamin, da die Dauer des Fiebers durch Fieberstich allein bei Mäusen nur wenige Stunden andauert. Vier Stunden nach dem Fieberstich wurde 10 Mäusen 0,02 g Supronal subkutan injiziert. Zu dieser Zeit lag der Mittelwert der Fiebertemperatur aller Tiere mit 38,3° C also 2,1° C über der Ausgangstemperatur. In 2 Stunden 45 Min. fiel die Temperatur der Supronalmäuse unter die Ausgangstemperatur auf 36,1° C, während die Temperatur der 11 Kontrolltiere mit 37,9° C noch 1,7° C über der Ausgangstemperatur lag. Nach diesem starken Abfall stieg die Temperatur der Supronalgruppe in 3 Stunden kontinuierlich bis auf 36,5° C an. 1 Stunde 45 Min. nach der Injektion bestand zwischen Supronal- und Kontrollmäusen ein Temperaturunterschied von 1,8° C. Dieser Wert liegt außerhalb des dreifachen mittleren Fehlers und ist dadurch statistisch gesichert.

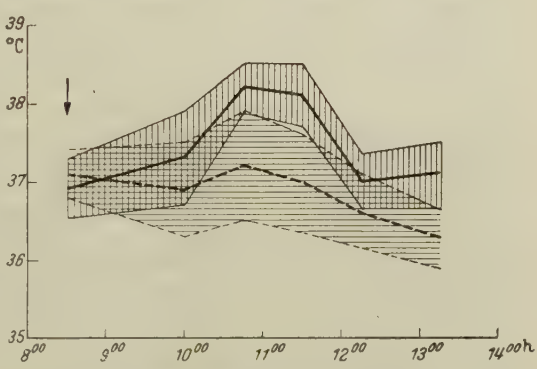


Abb. 2. Wirkung des Supronal auf das Pyriferfieber der Maus. Mittelwert der Rektaltemperatur von 24 Mäusen bei ↓ Injektion von 100 Einheiten Pyrifer i.p. (———), 100 Einheiten Pyrifer und 0,02 g Supronal i.p. (- - - - -). Der dreifache mittlere Fehler ist durch Schraffierung dargestellt.

Um den Einfluß des Supronal auf das durch Bakterientoxine erzeugte Fieber zu prüfen, gaben wir im zweiten Versuch (s. Abb. 2) 24 Mäusen 100 Einheiten Pyrifer intraperitoneal. Die Fieberspitze bei den Kontrolltieren lag mit 38,2° C 1,3° C über der Ausgangstemperatur von 36,9° C und war nach 1 Stunde 30 Min. erreicht. Die Temperatur der Supronalmäuse lag mit einer Ausnahme bei allen Messungen unter dem Ausgangswert von 37,2° C. 2 Stunden 15 Min. nach der Injektion bestand zwischen Supronal- und Kontrollmäusen eine Temperaturdifferenz von 1,2° C. Diese Spanne liegt außerhalb des dreifachen mittleren Fehlers und ist dadurch statistisch gesichert.

Beide Versuchsreihen zeigen also, daß *Supronal an der Maus antipyretisch auf das nichtinfektionsbedingte Fieber wirkt.* Die anfangs gestellte Frage ist dahingehend zu beantworten, daß die Entfieberung nach Supronal bei Infektionen nicht ohne weiteres der Überwindung der Infektion gleichzusetzen ist. Auf das Abklingen der Infektion

kann erst dann geschlossen werden, wenn die Temperatur weiterhin normal bleibt und die übrigen klinischen Erscheinungen der Infektion verschwinden. Die antipyretische Wirkung des Supronal erklärt andererseits vorübergehende Fieberemissionen bei weiterbestehender Infektion, wie sie am Krankenbett nach Supronalgaben des öfteren beobachtet werden.

Literatur.

[1] Bickenbach, W. u. K. Knörr: Geburtsh. u. Frauenhk. **7**, 146 (1947). — [2] Heilmeyer, R. u. W. Keiderling: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 13. — [3] Löffler u. R. Hegglin: Schweiz. med. Wschr. **1942**, 7. — [4] Nicklai, H.: Münch. med. Wschr. **1941**, 784. — [5] Brandis, A.: Klin. Wschr. **1942 II**, 1037. — [6] Konzett, H. u. A. v. Warsberg: Klin. Wschr. **1944**, 54. — [7] Beeson, P. u. C. A. Janeway: Amer. J. med. Sci. **200**, 632 (1940). — Ref. Chem. Zbl. **1941**, 1957. — [8] Knoppers, A. Th.: Acta brev. neerl. Physiol. etc. **12**, 99 (1942). — Ref Ber. Physiol. **132**, 240 (1943). — [9] Savoretti, G.: Med. sper. Arch. ital. **7**, 133 (1940). — Ber. Physiol. **127**, 200 (1940). — [10] Kramer, F.: Schweiz. med. Wschr. **1942**, 550. — [11] Nicolai, H.: Münch. med. Wschr. **1941**, 1084. — [12] Moeschlin, Sven: Schweiz. med. Wschr. **1942**, 510. — [13] Mischer, G.: Schweiz. med. Wschr. **1942**, 521. — [14] Unshelm, E. u. W. Hofmann: Z. exper. Med. **102**, 43 (1938). — [15] Ringl, A.: Münch. med. Wschr. **1942**, 348. — [16] Högler, F. u. K. Loibl: Wien. klin. Wschr. **1942 II**, 644. — Ref. klin. Wschr. **1943**, 40. — [17] Sapinsky, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. **191**, 70 (1944).

Dr. O. Nacke (21a) Münster i. Westfalen, Westring 11.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 5—7 (1949).

Aus der Universitäts-Frauenklinik Münster i. Westf.
(Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach).

Über die Wirkung des Sulfathioharnstoffs (Badional) auf das nichtinfektiöse Fieber der Maus.

Von
Otto Nacke und Marianne Weber.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Dezember 1948.)

Die Beobachtung der schnellen Entfieberung bei puerperalen Infektionen nach Badional gab Veranlassung, zu untersuchen, ob der Temperaturabfall teilweise oder ausschließlich durch eine antipyretische Wirkung des Präparates hervorgerufen sein kann.

Der Einfluß einiger älterer Sulfonamide auf die Wärmeregulation ist in einer früheren Arbeit erörtert[1].

Methode.

Männliche weiße Mäuse wurden in einem Thermostaten, der an anderer Stelle genauer beschrieben wird, bei 23° C gehalten, und die Temperatur $^1/_2$stündlich rektal in einer Tiefe von 11 mm thermoelektrisch gemessen. Verwendet wurden im ersten Versuch 24, im zweiten 27 Mäuse. Aus den Einzelergebnissen wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt und in Kurven dargestellt. Den dreifachen mittleren Fehler * kennzeichneten wir durch Schraffierung (Abb. 1).

In einer ersten Versuchsreihe wurde bei 24 Mäusen das Fieber durch Fieberstich mit intrazerebraler Injektion von 0,01 cm³ einer 1,5%igen Lösung von Tetrahydrobetanaphtylamin in Äthernarkose erzeugt. Hierdurch stieg der Mittelwert der Temperatur aller Tiere gleichmäßig im Verlauf von 5 Stunden von einer Ausgangstemperatur von 36,9° C auf 38,4° C an. 9 Stunden nach der Injektion lag die Körperwärme mit 37,5° C noch 0,6° C über dem Anfangswert. Bei einer Fieberhöhe von 38,6° C wurde 12 Mäusen 0,025 g Badional, in

* Standardabweichung $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{r} y_i\,(x_i - m)^2}$ σ = Standardabweichung, n = Umfang, y_i = Häufigkeit, x_i = Variante, m = arithmetischer Mittelwert. Dreifacher mittlerer Fehler: 3 fm $= \pm 3\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$. Nach F. Ringleb: Mathematische Methoden der Biologie. Berlin-Leipzig: Teubner 1937.

0,1 cm³ physiologischer Kochsalzlösung gelöst, und den Kontrolltieren 0,1 cm³ physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Hierauf fiel die Temperatur der Badional-Mäuse in 15 Min. auf 37,0° C.

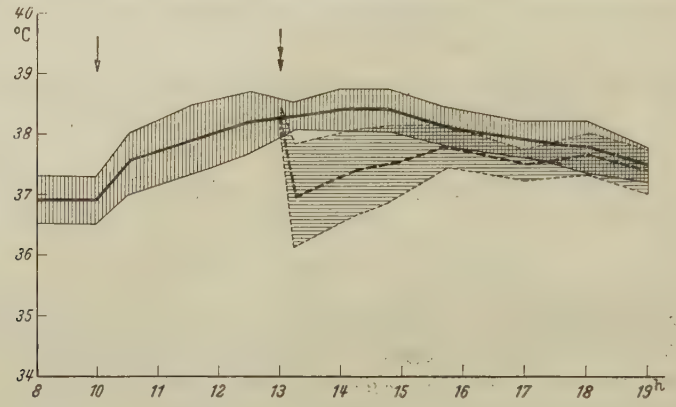


Abb. 1. Wirkung des Badional auf das Wärmestichfieber der Maus. Mittelwert der Rektaltemperatur von 24 Mäusen. Bei ↓ Fieberstich, bei ↓ 0,025 g Badional. ——— Kontrollmäuse, - - - - - Mäuse mit Badional.

Nach dieser schnellen Senkung stieg die Temperatur dieser Tiere langsam an und erreichte bis auf 0,1° C Differenz 5 Stunden nach der Injektion wieder die Temperatur der Kontrolltiere. Der Abfall nach

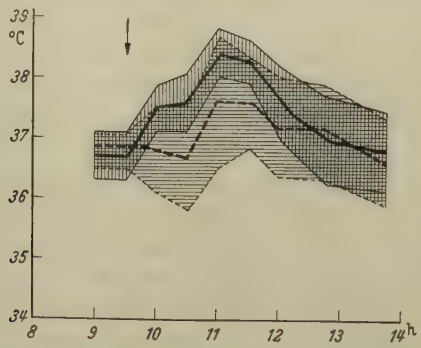


Abb. 2. Wirkung des Badional auf das Pyriferfieber der Maus. Mittelwert der Rektaltemperatur von 27 Mäusen. Bei ↓ 100 Einheiten Pyrifer (14 Mäuse) ———. Bei ↓ 100 Einheiten Pyrifer und 0,025 g Badional (13 Mäuse) - - - - -.

Badional liegt außerhalb des dreifachen mittleren Fehlers und ist dadurch statistisch gesichert (Abb. 2).

Um den Einfluß auf das durch Bakterientoxine erzeugte Fieber zu prüfen, gaben wir in einer zweiten Versuchsreihe 13 Mäusen 100 Einheiten Pyrifer zusammen mit 0,025 g Badional intraperitoneal. 14 Kontrollmäuse erhielten nur 100 Einheiten Pyrifer intraperitoneal.

1 Stunde 30 Min. nach der Injektion war das Fieber der Kontrollmäuse von 36,7 auf 38,4° C gestiegen, während mit 37,6° C die Badionalmäuse 0,8° C unter dieser Spitze lagen. Nach 3 Stunden 30 Min. hatten die Mäuse mit Badional die Temperatur der Kontrollmäuse wieder erreicht. Die Temperatursenkung durch Badional liegt bei diesem Versuch innerhalb des Zufallbereiches, ist jedoch unter Berücksichtigung des vorhergehenden Versuchsergebnisses wahrscheinlich. Aus der in den vorliegenden Versuchen nachgewiesenen antipyretischen Wirkung des Badional ist zu folgern, daß die Entfieberung bei Infektionskrankheiten nach diesem Präparate nicht unbedingt einer Heilung gleichzusetzen ist.

Zusammenfassung.

Badional (Sulfathioharnstoff) senkt das Fieber nach Fieberstich mit intrazerebraler Injektion von Tetrahydrobetanaphtylamin bei Mäusen. Diese Wirkung dauert 5 Stunden an.

Eine antipyretische Wirkung des Badional auf das Fieber von Mäusen, die mit 100 Einheiten Pyrifer behandelt werden, ist wahrscheinlich.

Literatur.

[1] Nacke, O. u. M. Weber: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **1948**, H. 13; **207**, H. 1 (1949).

Dr. O. Nacke, (21a) Münster i. Westfalen, Westring 11.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 8—13 (1949).

Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Werner Hueck).

Über die Einwirkung von Magen-Darm-Fermenten auf Gewebsthrombokinase.

Von

Hans Bayerle und Rudolf Marx.

(Eingegangen am 23. November 1948.)

Im Jahre 1912 stellte Howell[1] die Hypothese auf, daß die Thrombokinase sich aus 2 Komponenten zusammensetze, einer Eiweiß- und einer Lipoidkomponente. Seither wurden von anderen Autoren verschiedene Vorstellungen über die chemische Struktur der Thrombokinase entwickelt. Fischer und Hecht[2], Schlössmann[3] und Lenggenhager[4] hielten sie für einen Eiweißkörper von Albumincharakter, Patek und Taylor[5], Bandien und van Creveld[6], Astrup und Darling[7], Widenbauer und Reichel[8] schreiben ihr Globulincharakter zu.

Die neuesten Untersuchungen von Cohen und Chargaff[9] im Jahre 1940 und Studer[10] im Jahre 1946 ergaben aber die Richtigkeit der ersten Vorstellung von Howell, dem wir auch die klinisch so wichtig gewordene Substanz Heparin verdanken.

Nach den Untersuchungen der zuletzt genannten Autoren läßt sich jedenfalls Thrombokinase in eine Lipoidkomponente und eine Eiweißkomponente zerlegen und sodann auch wieder zusammenfügen.

Die genauere chemische Aufklärung der Lipoidkomponente ist noch nicht geglückt. Der Meinung, daß es sich um ein Kephalin handele, stehen die Untersuchungen von Fischer und Hecht (a. a. O.[2]) gegenüber, die fanden, daß die Thrombokinasewirksamkeit eines Kephalinpräparates um so geringer wurde, je mehr die Autoren in der Reinigung des Kephalins präparativ fortschritten. Es ist also demnach nicht unmöglich, daß die Thrombokinasewirksamkeit einer Kephalinbegleitsubstanz bzw. präparativ gesehen einer Kephalinverunreinigung zukommen könnte. Zudem ist zu bemerken, daß nach Thierfelder und Klenk[11] ein reines Kephalin nicht bekannt ist. Die früher hergestellten Präparate sollen nach Thierfelder und Klenk meist lezithinhaltig sein. Da die Kephaline außerdem licht- und sauerstoffempfindlich sind, sind vergleichende Aussagen über die Thrombokinaseaktivität nicht ohne erhebliche Schwierigkeiten möglich.

Die Thrombokinase hat nun trotz der Ungeklärtheit ihrer genauen chemischen Konstitution in den letzten Jahren erheblich an praktischer Bedeutung und an Interesse gewonnen, da stabile Thrombokinasepräparate für den klinisch bedeutsamen Prothrombinzeittest notwendig und daher in verschiedenen Ländern in den Handel gebracht worden sind.

Darüber hinaus sind Thrombokinasepräparate als Hämostyptika für den lokalen Gebrauch empfohlen worden (z. B. Hämostyphyn in den Niederlanden, Hämostyptikum Hecht usw.).

Der eine von uns[12] hatte bei seinen früheren Studien über Gewebsthrombokinasen vermutet, daß eventuell Thrombokinasepräparate in

hohen Dosen peroral verabreicht noch wenigstens teilweise im Duodenum lokal wirksam seien und eventuell bei Blutungen im oberen Darmabschnitt von Nutzen sein könnten. Um dieser Frage der peroralen Wirksamkeit bzw. der Möglichkeit der Wirksamkeit von hohen Thrombokinasedosen lokal im Darm und eventuell allgemein nach Resorption und Anreicherung zumindest in gebundener Form im Blut nachzugehen, stellten wir Versuche über die Einwirkung von Pepsin, Salzsäurepepsin und Trypsin-Lipase aus Pankreas auf Gewebsthrombokinase an. Zugleich wurden die Gerinnungs- und Prothrombinzeitwerte nach peroraler Verabreichung verschiedener Thrombokinaselösungen beim Kaninchen untersucht.

Zunächst ergab sich, daß ein Hirnthrombokinasepräparat die Ansäuerung durch Salzsäure auf p_H 2 über 24 Stunden bei 37° C wider Erwarten mit nur mäßiger Schädigung seiner Aktivität vertrug (s. Tabelle 1 im Experimentellen Teil). Pepsin zerstörte bei p_H 2 die Thrombokinaseaktivität vollkommen. Darüber hinaus hemmte es stark die Gerinnbarkeit rekalzifizierten Magnesiumsulfatplasmas. Dabei zeigten schon 5 mg des Pepsinpräparates eine ausgesprochene Wirkung. Auch Vollblut mit Pepsinzusatz allein zeigte eine geringe, aber deutliche Hemmung der Gerinnbarkeit. Ebenso wurde rekalzifiziertes Oxalatplasma durch Pepsin in seiner Gerinnbarkeit gehemmt. Durch 50 mg Pepsinzusatz zu 1 cm^3 Oxalatplasma wurde dessen Gerinnbarkeit durch Thrombin aufgehoben (s. Tabelle 2). Daraus ist zu folgern, daß Thrombokinase im Magen bei normalen Salzsäure-Fermentverhältnissen wohl zum größten Teil zerstört wird.

Worauf die Hemmwirkung des Pepsins in Plasmen und Blut beruht, muß noch genauer untersucht werden. Vielleicht handelt es sich dabei um eine Proteolysewirkung bei p_H 7 oder um einen Eiweißeffekt.

Die Bestimmung der Einwirkung von Trypsin bzw. Trypsin-Lipase ist dadurch kompliziert, daß Trypsin selbst eine Thrombokinasewirkung hat[13], die allerdings nur bei bestimmter, geeigneter Dosierung meßbar wird[14] (s. Tabelle 3). Bei zu hoher Dosierung der Trypsinzugabe zum Gerinnungsansatz kommt es zu einer proteolytischen Andauung des Fibrinogens und des Thrombins. Nur bei niederer Dosierung kommt es zur Aktivierung des Prothrombins, wahrscheinlich auf dem Wege der Proteolyse eines Eiweißhemmstoffes des Thrombins, der mit dem Thrombin zusammen den Prothrombinkomplex bildet.

Es wurde daher zuerst in Vorversuchen diejenige Dosis Trypsin gesucht, die für den Testansatz geeignet war. Die Trypsinwirkung wurde nach Beendigung der Einwirkzeit auf Thrombokinase durch Aufkochen während 1 Min. aufgehoben. Es zeigte sich, daß Thrombokinase durch Einwirkung des Pankreasextraktes zerstört wird (s. Tabelle 4).

Demnach ist eine lokale Wirkung von Thrombokinaseextrakten im Verdauungstrakt sehr unwahrscheinlich. Welche Bedeutung der Lipase

beim Thrombokinaseabbau zukommt, muß noch gesondert untersucht werden.

Bürger und Schrade[15] haben durch perorale Olivenölzufuhr Verkürzungen der Kapillarblutgerinnungszeit (gemessen nach der Bürkerschen Methode[16]) festgestellt. Bürger und Kohl[17] glaubten weiterhin gesetzmäßige Einwirkungen einer Reihe von Nahrungsstoffen auf die Kapillarblutgerinnungszeit gesehen zu haben. Wir hielten es unter diesen Gesichtspunkten für möglich, daß es unter der Einwirkung reichlich zugeführten Thrombokinaseextraktes im Blut zu einer vorübergehenden Lipoidämie kommen könnte, die eine Einwirkung auf das Gerinnungssystem zur Folge haben könnte.

Wir fütterten daher 11 Kaninchen mit der Schlundsonde mit Thrombokinaseextrakten als Hammel- und Schweinehirn und prüften unter den von R. Marx[18] erarbeiteten Kautelen die Plasmagerinnbarkeit nach dem Prinzip von Howell und die Prothrombinzeit nach dem Quick-Verfahren. Es konnte jedoch keine Wirkung mit diesen beiden Methoden festgestellt werden (s. Tabelle 7).

Aus unsern Ergebnissen muß also geschlossen werden, daß Thrombokinasepräparaten weder eine lokale, gastroenterale, noch eine allgemeine Gerinnungsvalenz erhöhende Wirkung zukommt.

Ob sich mit der Bürkerschen Methode der Bestimmung der Reaktionszeit der Gerinnung von Kapillarblut eine Einwirkung gesetzmäßiger Art wird finden lassen, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Experimenteller Teil.

Tabelle 1. *Einfluß der Säuerung von Thrombokinase auf das Gerinnungssystem.*

Gerinnungsansatz. Im Gesamtvolumen von 4,0 cm³ sind enthalten 2,0 cm³ Magnesiumsulfat, Plasma 1:10; 0,1 cm³ Thrombokinase; 0,1 cm³ Kalziumlösung (10 mg $Ca^{\cdot\cdot}$/cm³).

Thrombokinase. 200 mg Trockenpräparat aus Hammel- oder Schweinehirn mit 5,0 cm³ 0,9%iger NaCl 20 Min. bei 50° C im Wasserbad extrahiert; die überstehende, vorsichtig abzugießende Flüssigkeit wird verwandt.

Behandlungsart	Gerinnungszeit eines Rinder-Magnesiumsulfatplasma bei Zusatz von 0,25 cm³ Thrombokinaselösung in Minuten und Sekunden
Original-Thrombokinaseextrakt	48 Sek.
Auf p_H 2 gebracht und sofort auf p_H 7 zurückneutralisiert	1 Min. 14 Sek.
Original-Thrombokinase mit Toluol 20 Stunden bei 37° C gehalten	52 Sek.
Auf p_H 2 20 Stunden bei 37° C gehalten und vor der Bestimmung erst neutralisiert	2 Min. 15 Sek.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß Thrombokinase aus Gehirn die Ansäuerung durch Salzsäure auf p_H 2 über 20 Stunden mit nur mäßiger Schädigung ihrer Aktivität überdauert.

Tabelle 2. *Hemmungswirkung von Pepsin im Gerinnungssystem rekalzifiziertes Rindermagnesiumsulfatplasma + Thrombokinase.*

Gerinnungsansatz und Thrombokinase s. Tabelle 1. — Zugesetztes Pepsin: Cudahy-Präparat. — Gerinnungszeitbestimmung (Howell-Zeit): Referiert R. Marx[18]. — Gerinnungszeitbestimmung von Venenblut: 2,0 cm³ Blut wurden zügig mit einer Rekordspritze entnommen und sofort in Reagensgläser gespritzt, die in einem Wasserbad von 37° C hingen. Dieses Moment wurde mittels Stoppuhr festgehalten. Der Zeitpunkt der Gerinnung wird durch Neigen der Reagensgläser erkannt.

	Zugesetzte Menge Pepsin in mg	Gerinnungszeit in Minuten und Sekunden
A. Gerinnungssystem:	0	1 Min. 3 Sek.
Rekalzifiziertes Rindermagnesiumsulfatplasma + Thrombokinase	0,5	1 Min. 10 Sek.
	1	1 Min. 20 Sek.
	5	30 Min.
	10	∞
B. Gerinnungssystem:	0	58 Sek.
Rinderoxalatplasma + Kalziumchlorid	1	58 Sek.
	10	1 Min. 43 Sek.
	50	∞
C. Gerinnungssystem:	0	2 Min. 30 Sek.
Venenvollblut	1	2 Min. 30 Sek.
	5	3 Min. 40 Sek.
	10	3 Min. 50 Sek.

Tabelle 3. *Zerstörende Wirkung von Pepsin Cudahy auf Thrombokinaselösung.*

Gerinnungstestsystem: Rindermagnesiumsulfatplasma bei Zugabe von 0,25 cm³ Thrombokinaselösung. — Gerinnungsansatz: s. Tabelle 1.

Pepsin je cm³ saurer Thrombokinase mg	Einwirkungsdauer in Stunden	Gerinnungszeit
1	0	1 Min. 30 Sek.
1	2	15 Min. 15 Sek.
1	24	35 Min.
Pepsin zu Original-Thrombokinase (nicht angesäuert)		
1	0	50 Sek.
1	2	1 Min. 45 Sek.
1	24	2 Min. 5 Sek.

Da das verwendete Rindermagnesiumsulfatplasma bei Zugabe von Kalziumlösung (0,1 cm³ einer Lösung, die 10 mg $Ca^{\cdot\cdot}$/cm³ enthält) innerhalb 35 Min. gerinnt, zeigt die Tabelle 3, daß Pepsin die Thrombokinase bei p_H 2 innerhalb 1 Tages bei 37° C zerstört.

Den normalen Kaninchen von durchschnittlich 5—6 Pfund Gewicht wurde je 20 cm³ Thrombokinaseextrakt mit der Schlundsonde verabreicht — die Kaninchen waren stets mindestens 14 Tage in keinerlei Versuch gewesen —.

Tabelle 4. *Thrombokinasewirkung von Extrakt aus Pankreastrockenpräparat auf Oxalatplasma.*

Gerinnungszeit siehe Tabelle 1. — Tryptische Wirksamkeit: 3200 Fuld-Großeinheiten; Lipase-Wirksamkeit: 0,64 Butyraseeinheiten.

Trockenpräparat mg	Gerinnungszeit in Minuten und Sekunden
0	2 Min. 8 Sek.
50	∞
30	∞
20	1 Min. 45 Sek.
15	1 Min. 23 Sek.
10	1 Min. 26 Sek.
5	1 Min. 40 Sek.
3	1 Min. 41 Sek.

Tabelle 5. *Wirkung von Trypsin im Magnesiumsulfatplasmatest.*

Gerinnungszeit in Minuten.

Trypsin ungekocht mg	Mit $CaCl_2$ Zusatz	Ohne $CaCl_2$	Mit Trypsin gekocht
0	22	—	—
2,5	—	—	—
1,25	16	∞	—
0,62	15^{20}	∞	60
0,31	18^{30}	∞	60
0,15	18^{30}	—	60
0,07	—	—	40

Die Thrombokinaseaktivität des verabreichten Präparates ist dadurch gekennzeichnet, daß ein jeweils frisches Rindermagnesiumsulfatplasma in 1 Min. durch 0,1 cm^3 Extrakt nach Rekalzifizierung zur Gerinnung gebracht werden konnte.

Aus der Tabelle 7 kann entnommen werden, daß die Plasmagerinnungswerte und die Prothrombinzeitwerte nach der peroralen Thrombokinaseverabreichung innerhalb der Grenzen der Norm lagen.

Die Plasmagerinnungszeiten normaler, gesunder Kaninchen lagen nach Reihenversuchen (über 200 Werte) zwischen 35 und 201 Sek., wobei Werte von über 160 Sek. selten waren.

Die Mittelwerte für die Prothrombinzeitwerte lagen mit unverdünntem Plasma bei 11,8 Sek., bei 1:1 verdünntem Plasma bei 15,5 Sek., bei 1:5 verdünntem Plasma bei 23,4 Sek. (Mittelwert aus 20 Normalplasmen).

Tabelle 6. *Zerstörende Wirkung von Trypsin auf Thrombokinase.*

Gerinnungszeit in Minuten und Sekunden nach Mischung.

	Einwirkungszeit des Trypsin auf die Thrombokinase nach			
	0 Stunden	1 Stunde	4 Stunden	24 Stunden
10 mg Trocken-Pankreasextrakt + 10 cm^3 Thrombokinase	7^{10}	15	30	16^{16}
8 mg Trockenpankreasextrakt + 10 cm^3 Thrombokinase	3^{40}	6	10^{30}	12^{30}
2 mg Trockenpankreasextrakt + 10 cm^3 Thrombokinase	3^{20}	3^{20}	5^{30}	5^{55}
0 mg Trockenpankreasextrakt + 10 cm^3 Thrombokinase	2^{36}	1^{45}	2^{35}	4^{05}
Nur $CaCl_2$-Zusatz ohne Thrombokinasezusatz	34	34	34	20

Tabelle 7. *Zur Frage des Einflusses peroral verabreichter Thrombokinase auf die Plasmagerinnungszeit nach dem Prinzip von* Howell *und auf die Prothrombinzeit.*

Herkunft der verabreichten Thrombokinase	Zeit der Gerinnungsbestimmung nach der Thrombokinaseverabreichung in Stunden	Plasmagerinnungszeit in Sekunden	Prothrombinzeit in Sek. bei Verdünnung des Plasmas		
			unverdünnt	1:1	1:5
Hammelhirn . .	1,5	85	13	14	24
	1,5	159	13	14	20
	3	190	12	15	23
	3	172	12	13	16
	4,5	45	13	14	20
	4,5	59	12	15	23
Schweinehirn . .	3,5	56	—	—	—
	3,5	113	—	—	—
	3,5	112	—	—	—
Schweinehoden . .	3,5	41	—	—	—
Ziegenhirn	3,5	41	—	—	—

Zusammenfassung.

1. Pepsin-Salzsäure und Pankreasenzyme (Trypsin-Lipasepräparate) zerstörten Thrombokinase.

2. Pepsin hat in kleinen Dosen bei p_H 7 eine deutliche Hemmungswirkung auf die Gerinnbarkeit von Oxalat- und Magnesiumsulfatplasma und Vollblut.

3. Mit den verwendeten Methoden ließ sich keine Einwirkung auf die Gerinnbarkeit des Blutes von Kaninchen bei peroraler Thrombokinasezufuhr feststellen.

4. Mit einer lokalen hämostyptischen Wirkung peroral zugeführter Thrombokinase im Magen-Darmtrakt kann nicht gerechnet werden.

Literatur.

[1] Howell, W. H.: Amer. J. Physiol. **31**, 1 (1912). — [2] Fischer u. Hecht: Biochem. Z. **269**, 115 (1934). — [3] Schlössmann, H.: Bruns' Beitr. **579**, 503 (1912). — [4] Lenggenhager: Helvet. med. Acta **1**, 527 (1935). — [5] Patek and Taylor: J. clin. Invest. (Am.) **16**, 113 (1937). — J. amer. med. Assoc. **108**, 842 (1937). — [6] Bandien u. van Creveld: Acta neerld. Physiol. etc. **5**, 135 (1942). — [7] Astrup u. Darling: Acta physiol. scand. **3**, 168 (1942). — [8] Widenbauer u. Reichel: Biochem. Z. **309**, 100 (1941). — [9] Cohen and Chargaff: J. biol. Chem. (Am.) **136**, 243 (1940). — [10] Studer, A.: Festschrift Emil Barrel, Basel 1946, S. 229. — [11] Thierfelder u. Klenk: Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. Berlin: Springer 1930. — [12] Marx, R. u. H. Dyckerhoff: Biochem. Z. **316**, 1 (1943). — [13] Eagle and Harris: J. gen. Physiol. (Am.) **20**, 545 (1937). — Ferguson and Erickson: Amer. J. Physiol. **126**, 661 (1939). — u. Dyckerhoff, H. u. R. Marx: Biochem. Z. **313**, 107 (1942). — [15] Bürger, M. [14] W. Schrade: Klin. Wschr. **1936**, 550. — [16] Bürker: Arch. ges. Physiol. **149** (1912). — Wöhlisch, E.: In Bamann u. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung. Leipzig: Georg Thieme 1941. — [17] Kohl, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. **191**, 502 (1943). — [18] Marx, R.: Z. exper. Med. **114**, 18 (1944).

Dr. H. Bayerle, (13b) München 15, Thalkirchner Straße 36, Path. Inst. d. Univ.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 14—28 (1949).

Aus dem I. Anatomischen Institut der Anatomischen Anstalt München
(Direktor: Prof. Dr. R. Heiss).

Zur Frage der Vitalfärbung mit Prontosil*.

Von

Ekkehard Kleiss.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. Dezember 1948.)

Die Bedeutung der Vitalfärbung für farbanalytische Untersuchungen der Morphologie und Physiologie von Zellen und Organen ist nicht nur für die theoretische Wissenschaft, sondern auch für die praktische Medizin sehr groß, da erst durch diese Methoden ein Einblick in die Lebensvorgänge der Bausteine des Organismus möglich war. Aber nicht nur zur Untersuchung und Klärung morphologisch-physiologischer Probleme findet die Vitalfärbung Anwendung, auch in einem anderen bedeutenden Fachgebiet der Medizin, in der Chemotherapie, sehen wir eine weitgehende Verwendung verschiedenster Farbstoffe und ihrer Derivate. Man kann getrost sagen, daß durch die Ausgestaltung der histologischen Färbetechnik, insbesondere der Vitalfärbung, auch der Grundstein für die Auffindung und Applikation chemotherapeutisch wirksamer Stoffe gelegt wurde.

Von den histologischen Färbemethoden ist die Vitalfärbung unbestreitbar die älteste. Die Chinesen kannten schon seit frühesten Zeiten die Lebendfärbung von Geweben (Pilliet, zit. nach v. Möllendorff) und im Mittelalter wurde die Krappfärbung des wachsenden Knochens bereits zu naturwissenschaftlichen Studien benützt. Im 18. Jahrhundert sind in diesem Zusammenhang die Namen Rutherford, Gibson, Duhamel u. a. zu nennen (vgl. v. Möllendorff). Einen großen Fortschritt in der histologischen Färbetechnik bedeutet die Einführung des Karmins, welches zuerst von Cohn und Göppert (1843) verwendet wurde. Im Jahre 1856 führte Osborne Vitalfärbungen mit Karmin an Pflanzen (Weizenkeimlingen) durch. 1857 wurde es von Hartig systematisch untersucht und im gleichen Jahre von Gerlach, dem „Vater der Karminfärbung", definitiv eingeführt. Wenige Jahre später (1863) wurden von Waldeyer die ersten Erfolge mit Anilinfarben erzielt, und zwar verwendete er das Fuchsin, welches zur damaligen Zeit in Frankreich bereits im großen dargestellt wurde. 1875 kam durch Weigert ein Derivat des Parafuchsins, das Methylviolett (methyliertes Fuchsin), für die Färbung von Bazillen zur Anwendung. Wenn auch alle diese Farbstoffe anfangs nur zu morphologischen Zwecken verwendet wurden, war doch damit der erste Schritt zu ihrer Einführung auch in andere Fachgebiete der Medizin getan. Schon damals wurde auch die bakterizide Wirkung dieser Farbstoffe erkannt (R. Koch), die z. B. bei dem bereits erwähnten Methylviolett auch heute noch manchmal Anwendung findet (Pyoktanin). Auch die von Conradi und Drigalski festgestellte selektiv-bakterizide Wirkung mancher Farbstoffe (z. B. des Kristallvioletts) fand bei Bakteriennährböden zur Darstellung von Rein-

* Herrn Prof. Dr. B. Romeis zum 60. Geburtstag.

kulturen verschiedentlich Anwendung (vgl. Forst). Aus diesem kurzen Überblick über die ersten Anfänge der Vitalfärbung geht hervor, daß die Verbindung zwischen histologischer Färbung einerseits und Chemotherapie andererseits schon von Anfang an bestand, und diese Zusammenhänge zwischen spezifischer Färbewirkung und spezifisch-chemotherapeutischer Wirkung waren es auch, die Ehrlich zu seinen grundlegenden Untersuchungen über Azofarbstoffe (und später auch Arsenikalien) anregten.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung trennten sich allerdings die Wege der Vitalfärbung und der Chemotherapie wieder. In dem ziemlich ausgedehnten Schrifttum finden sich zusammenfassende Arbeiten von Fischel (1910), v. Möllendorff (1920—1926), Schulemann (1927), Küster (1928), Vonwiller (1928), Pfeiffer (1929—1930), Keller (1930), Gicklhorn (1931), Gellhorn (1931 bis 1932), Gutstein (1932), Nagel (1933), Seki (1933—1936), Becker (1936), Ries (1936—1938), Kiyono, Amano (1937), Monnè (1942) u. a.

Eine Definition des Begriffes „Vitalfärbung" stößt von vornherein auf größte Schwierigkeiten, da zuerst der Begriff „Leben" genauer umrissen und jedes einzelne der zahlreichen Kriterien der Vitalität und der lebenden Substanz in Betracht gezogen werden müßte (vgl. Gicklhorn). Das heißt mit anderen Worten: Die Abgrenzung des Begriffes „vital" ist weder morphologisch noch histophysiologisch genau zu fassen und bei vielen Färbungsprodukten „intra vitam" handelt es sich um „tote" Anteile des betreffenden Gewebes (abgestorbene Zellen oder Zellteile, „leblose" Neubildungen infolge der Färbung usw.). In diesem Zusammenhang spielt auch der Begriff des „Normalen" eine wichtige Rolle, denn wir wissen vielfach nicht, inwieweit es sich bei verschiedenen Färbungsergebnissen um pathologische Reaktionen der Zellen bzw. Gewebe handelt. Wenn trotzdem der Begriff „Vitalfärbung" definiert werden soll, so möchte ich unter den vielen und ausführlichen Definitionen der Literatur zwei herausgreifen, die bei aller Kürze doch das Wesentliche besagen.

Romeis bringt in seinem Taschenbuch die im Original wesentlich kompliziertere Definition Fischeis auf die einfache Formel: „Als Vitalfärbung im allgemeinen bezeichnet man Färbungsmethoden, welche am lebenden Tier (oder an lebenden Zellen) mit Erfolg vorgenommen und von diesen ohne sichtlichen Schaden längere Zeit ertragen werden."

Und Küster schreibt in der „Methodik der wissenschaftlichen Biologie": „Von Vital- oder Lebendfärbung einer Zelle spricht man in allen denjenigen Fällen, in welchen es gelingt, irgendwelche Teile der Zelle zu färben, ohne ihr Leben zu beeinträchtigen oder gar zu zerstören."

Mit beiden Definitionen ist einerseits das Gebiet der Vitalfärbung klar umrissen, andererseits aber auch die ganze Problematik und Schwierigkeit der Vitalfärbungsversuche hell beleuchtet. Und außerdem weisen auch diese Definitionen wieder auf den erwähnten engen Zusammenhang zwischen Vitalfärbung und Chemotherapie hin; denn wenn auch der Zweck beider Fachgebiete verschieden ist, so ist doch beiden das Bestreben gemeinsam, für den Organismus als solchen unschädliche Stoffe zur Anwendung zu bringen.

Durch die enge chemische Verwandtschaft des Prontosils mit verschiedenen Azofarbstoffen, insbesondere mit dem von Monnè und anderen zur Darstellung der Golgisubstanz verwendeten Chrysoidin, angeregt, unternahm ich es, die Vitalfärbung mit Prontosil zu untersuchen.

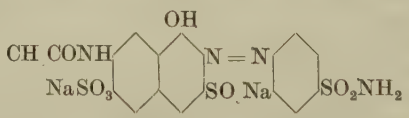
In der mir zugänglichen und bekannten Literatur habe ich nur eine einzige Arbeit gefunden, die sich mit dem gleichen Problem befaßt. Es ist dies die Arbeit

von Carter, welcher Getreidekeimlinge und Insekten (Larven und Imagines von Peregrinus maidis) mit Prontosil färbte. Auch er läßt jedoch die Frage offen, ob es sich bei diesen Färbungsversuchen um eine echte Vitalfärbung bestimmter Organe oder Gewebe handle. Reihenuntersuchungen an Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz, Gehirn, Blut und Muskel unter Verwendung von Prontalbin finden sich nur bei Domagk. Janbon und seine Mitarbeiter untersuchten zwar eine größere Anzahl von Organen und Geweben auf ihren Sulfonamidgehalt (Sulfapyridin, Sulfathiazol, Prontalbin u. a.), jedoch handelt es sich dabei nur um einmalige Feststellungen an nach Sulfonamidmedikation verstorbenen Patienten. P'an und andere untersuchten den Sulfonamidgehalt des Auges und seiner einzelnen Teile nach lokaler und allgemeiner Sulfonamidapplikation. Carryer und andere wiesen die Ausscheidung von Sulfonamiden in Speichel, Galle, Magen- und Pankreassaft nach.

In der vorliegenden Mitteilung soll vor allem der ohne besondere histologische Technizismen erkennbare Vorgang der Vitalfärbung mit Prontosil und in Verbindung damit der im Organismus vor sich gehende Speicherungs- bzw. Ausscheidungsprozeß des Farbstoffes behandelt werden, da die genauere histologische Untersuchung der einzelnen Organe und Gewebe leider auf zeitbedingte technische Schwierigkeiten stieß. Eine definitive und kritische Deutung der hier erhobenen Befunde muß späteren Untersuchungen und Experimenten vorbehalten bleiben.

Material und Technik.

Ich verwendete 32 albinotische Ratten, welche je nach Größe und Gewicht $^1/_2$ bis $1^1/_2$ cm³ Prontosil solubile „*Bayer*“ — also 25—75 mg des Dinatriumsalzes der 4'-Sulfonamido-phenyl-azo-7-acetylamin-1-oxynaphthalin-3,6-disulfosäure (s. Abb. 1) intramuskulär erhielten. Diese Dosis entspricht, da es sich meist um



Prontosil (solubile) („Neoprontosil“)

Abb. 1.

kleine bzw. juvenile Tiere handelte, etwa einer Menge von 1 g/kg Körpergewicht. Das Prontosil solubile wurde aus dem Grunde gewählt, weil es nach den Angaben von Hecht pharmakologisch weitgehend indifferent und (nach Raiziss und Severac) nicht toxisch für Ratten ist. Außerdem ist nach Barlow, Domagk u. a. das Prontosil solubile (in Amerika „Neo-Prontosil“ genannt) in noch höheren Dosen unschädlich als das Prontosil rubrum (Barlow gab bei Mäusen über 5 g/kg Körpergewicht).

Die Versuchsanordnung war die, daß jedes der verwendeten Tiere in einem bestimmten Zeitabstand ($^1/_4$ oder $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 Stunden) nach einmaliger Injektion getötet und im Anschluß daran sofort seziert wurde. Die einzelnen Organe wurden entnommen und im Zupfpräparat untersucht. Da bei dieser Methode ein Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung erforderlich ist, kam es zu einer ziemlich weitgehenden Extraktion des Farbstoffes, welche die erhobenen Befunde nur mittelbar verwertbar machte. Immerhin konnte man aber einen gewissen Überblick über die Anfärbung des Gewebes bekommen.

Um ein etwas genaueres Maß für die Verteilung des Farbstoffes im Gewebe zu erhalten, wurden außerdem kolorimetrische Untersuchungen (durch Vergleich mit entsprechenden Testlösungen des Farbstoffes) angestellt. Die gefundenen Werte waren teilweise etwas niedriger als nach den Angaben im Schrifttum (z. B. Domagk) zu erwarten war. Da es sich bei vorliegenden Untersuchungen aber nur um Vergleichswerte handelt, kann dieser Umstand außer acht gelassen werden.

In einer Vergleichsreihe wurden 16 Ratten mit Trypanblau vitalgefärbt, und zwar erhielt jedes Tier 0,5 cm^3 1%ige Trypanblaulösung intramuskulär bzw. tief subkutan. Sämtliche Präparate wurden nach der Sektion für spätere histologische Zwecke mit der Bouinschen Lösung konserviert. Trotz gleicher Haltung der Tiere aus ein und derselben Zucht waren ziemlich große Schwankungen im Farbstoffgehalt der Gewebe feststellbar. Diese Tatsache der individuell so verschiedenen Resorption findet bereits bei Domagk Erwähnung. Durch Kontrollversuche und Berechnung mittlerer Werte war ich bemüht, diese Fehlerquelle möglichst weitgehend auszuschalten. Aus diesem Grunde wurden die Werte auch nur auf 5 (bzw. 2,5) mg-% genau berechnet und sind als *Mittelwerte innerhalb der individuellen Schwankungsbreite der 4 angestellten Untersuchungsreihen* zu betrachten. Immerhin konnte ich feststellen, daß trotz aller individuellen Verschiedenheiten das relative Verhältnis der Werte zueinander ziemlich konstant war.

Untersuchungsergebnisse.

Haut und Schleimhäute. Bei äußerlicher Inspektion der Tiere ergab sich etwa folgender Ablauf der Färbung mit Prontosil solubile: Die ersten Anzeichen einer Verfärbung waren schon nach 10 Min. an den Ohren feststellbar, welche einen rasch zunehmenden roten Farbton zeigten. Im weiteren Verlauf färbte sich die Schnauze deutlich rot, und nach etwa $^1/_2$ Stunde waren auch die Pfoten leicht gerötet. Die ganze Färbung nahm rasch an Intensität zu, so daß nach 1 Stunde sowohl Ohren und Schnauze, als auch Extremitäten und Schwanz stark rot gefärbt waren. Diese intensive Färbung hielt für die nächsten 2 Stunden fast unverändert an, wobei die Tiere keinerlei abnormes Verhalten zeigten, wenn man von der kurz anhaltenden Schockwirkung nach der Injektion absieht. Nach insgesamt $4^1/_2$ Stunden begann die Färbung wieder zurückzugehen und war nach 8 Stunden fast verschwunden. Nach 10 Stunden waren die Tiere wieder vollständig normal gefärbt. Irgendwelche Nachwirkungen konnten nicht beobachtet werden.

Demgegenüber zeigten die mit Trypanblau gefärbten Kontrolltiere einen viel langsameren Anstieg der Färbung, die ihren Höhepunkt erst nach 5—6 Stunden erreichte, und deren Abfall ebenfalls wesentlich langsamer vor sich ging. Nach 10 Stunden war noch immer eine ziemlich starke Blaufärbung der Tiere erkennbar, die erst nach etwa 24 Stunden verschwunden war (s. Abb. 2).

Die bei der Sektion vorgenommene Untersuchung des subkutanen Gewebes ergab, daß bei Prontosilfärbung innerhalb der ersten $^1/_2$ Stunde bereits der Höhepunkt der Färbung erreicht wurde: Das Gewebe war intensiv orangerot gefärbt. Im Verlauf der nächsten Stunden nahm dieser Farbstoffgehalt wieder schrittweise ab (s. Abb. 3).

Auch an den Schleimhäuten war die Anfärbung sehr bald nach der Injektion erkennbar und ihr Höhepunkt war nach etwa einer Stunde erreicht. Die Entfärbung ging wesentlich rascher vor sich,

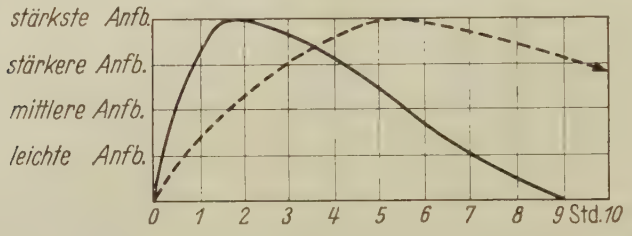


Abb. 2. ——— Färbungsverlauf bei Injektionen von Prontosil, — — — Färbungsverlauf bei Injektionen von Trypanblau.

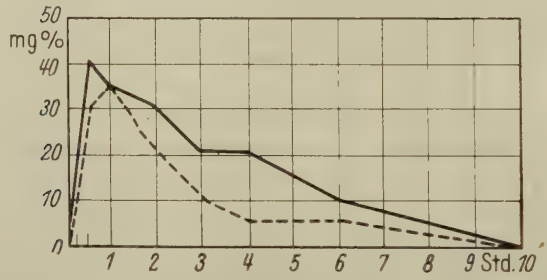


Abb. 3. ——— Subkutanes Bindegewebe, — — — Schleimhäute.

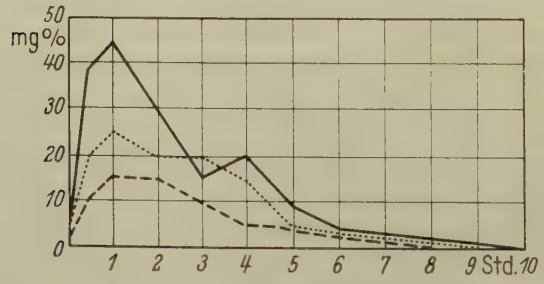


Abb. 4. ——— Muskulatur, — — — Knochengewebe (Sternum), ····· Knorpelgewebe (Rippenknorpel).

so daß bereits nach 4 Stunden nur mehr eine ganz geringgradige Tingierung erkennbar war.

Bei den Versuchen mit Trypanblau zeigten die Schleimhäute erst nach einer Stunde eine ganz geringe Blaufärbung, während das Maximum nach etwa 4 bis 5 Stunden erreicht wurde. Auch nach 10—12 Stunden waren die Schleimhäute ebenso wie das subkutane Bindegewebe noch immer blau verfärbt.

Muskel-, Knorpel- und Knochengewebe (s. Abb. 4). Im Muskelgewebe war ein sehr rascher Anstieg des Farbstoffgehaltes feststellbar,

der seinen Höhepunkt nach 1 Stunde erreichte. Die Entfärbung ging ebenfalls ziemlich rasch vor sich.

Demgegenüber war bei Verwendung von Trypanblau ähnlich wie bei den vorher genannten Geweben der Anstieg wesentlich langsamer, so daß erst nach 2 Stunden eine leichte Anfärbung der Muskulatur erkennbar war.

Die beim Knorpelgewebe (Rippenknorpel) gefundenen Werte waren wesentlich niedriger als beim Muskelgewebe, doch zeigte die Kurve des Färbungsablaufes bis zu dem nach 1 Stunde erreichten Höhepunktes ein analoges Verhalten. Die Entfärbung ging anfangs langsamer vor sich und erst nach 4 Stunden sanken die Werte etwas rascher ab. Am Ohrknorpel war der Färbungsverlauf ähnlich, jedoch hielt die Tingierung noch länger an als am Rippenknorpel.

Dieselbe Tatsache, allerdings mit entsprechend langsamerem Färbungsanstieg war auch bei Verwendung von Trypanblau erkennbar, wobei die Anfärbung des Ohrknorpels besonders eindrucksvoll war.

Während nach den Angaben Marshalls und seiner Mitarbeiter die Durchdringung des Knochengewebes mit Sulfonamiden — wenn überhaupt — nur äußerst langsam vor sich gehen soll, fand ich im Sternum schon 1—2 Stunden nach der Prontosilinjektion einen Höhepunkt der Färbung. Auch hier erfolgt die Ausscheidung relativ langsam. Am übrigen Knochengerüst war die Färbung nicht so stark, doch war auch z. B. an den langen Röhrenknochen der Extremitäten oder am Schädelskelett eine leichte Rötung etwa 2 Stunden nach der Injektion erkennbar.

Im Schrifttum finden sich Angaben über den Sulfonamidgehalt des Knochengewebes besonders bei Janbon, Chaptal und Lazergues, aus denen ebenfalls hervorgeht, daß die Werte in den Röhrenknochen niedriger sind als im Sternum. Die Autoren bringen dieses Verhalten in Zusammenhang mit dem Gehalt an Knochenmark. Genauen Aufschluß darüber kann erst eine histologische Untersuchung bringen.

Auge (s. Abb. 5). Die Untersuchungen des Sulfonamidgehaltes in den einzelnen Teilen des Auges finden in der Literatur ziemlich zahlreiche Erwähnung. Ich verweise diesbezüglich auf die Arbeiten von P'an, Regoll, Miranda, Scheie und Sonders, Turkell und Wilhelm, Pinkhof u. a. Die höchsten Werte des Sulfonamidgehaltes zeigte die Kornea (P'an, Miranda), Konjunktiva und Sklera enthalten nur geringere Mengen, ebenso die Linse, während der Glaskörper nur Spuren aufweist. Der Übertritt der Sulfonamide ins Kammerwasser erfolgt bei parenteraler Applikation sehr rasch und in verhältnismäßig hohen Konzentrationen. Auch in der Tränenflüssigkeit konnten Sulfonamide nachgewiesen werden, wobei die Werte bei entzündlichen Prozessen höher sind als im normalen Zustand.

Meine Untersuchungsergebnisse stimmen im wesentlichen mit diesen Angaben überein, obwohl von den angeführten Autoren andere (basische) Sulfonamide verwendet wurden. Lediglich in Linse und Glaskörper konnte ich ein Vorhandensein von Prontosil nicht feststellen, da nicht einmal Spuren einer Verfärbung nachweisbar waren.

Über den Ablauf der Speicherung bzw. Ausscheidung des Farbstoffes gibt Abb. 5 Aufschluß. Schon rein äußerlich zeigte sich eine orangerote Verfärbung des ganzen Bulbus, die sich von der üblichen Rotfärbung der Augen albinotischer Tiere wesentlich unterschied und besonders am herausgenommenen Augapfel gegen eine weiße Unterlage deutlich erkennbar wurde.

Auch die Tränendrüse war bereits 15 Min. nach der Injektion leicht rötlich tingiert und zeigte ähnlich der Gesamtfärbung des Bulbus maximale Anfärbung nach 1—2 Stunden. Die Entfärbung war nach 9—10 Stunden vollzogen.

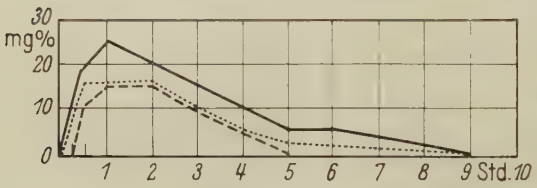


Abb. 5. ——— Kornea, — — — Sklera, ····· Kammerwasser.

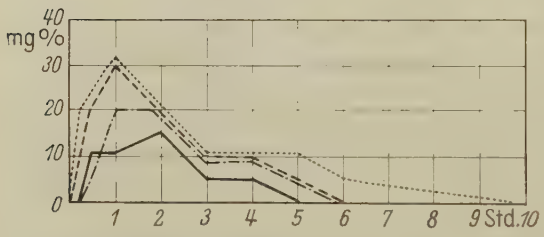


Abb. 6. ——— Magen (Fundus), ····· Dünndarm, — — — Magen (Pylorus), —·—·— Dickdarm.

Verdauungstrakt (siehe Abb. 6). Die Kurven des Färbungsverlaufes der einzelnen Abschnitte des Magen-Darmkanals zeigen ein ziemlich einheitliches Bild. Im allgemeinen kann man sagen, daß die geblähten Darmteile bei makroskopischer Betrachtung weniger stark gefärbt erschienen als die kontrahierten. Die Ursache hierfür ist wohl zum Teil die dem Kontraktionszustand entsprechende verschiedene Wanddicke und damit auch Schichtdicke des gefärbten Gewebes. Das war beim Magen besonders deutlich erkennbar. Allerdings waren aber auch die kolorimetrisch gemessenen Werte im Fundus- und Pylorusteil etwas verschieden, und zwar zeigte die Pylorusregion eine früher auftretende und intensivere Anfärbung, die sich dann längs der kleinen Kurvatur auch auf den Fundus ausbreitete, dort aber keine so hohen Werte erreichte. Auch verschwand die Färbung im Fundusteil um etwa 1 Stunde früher als im Pylorusabschnitt. Trotzdem glaube ich, daß es sich dabei weniger um grundlegende Verschiedenheiten in der Ausscheidung als vielmehr um mechanisch-statische Unterschiede handelte. (Nach den Angaben von CARRYER und JOY, sowie HUG erfolgt die Sulfonamidausscheidung unter anderem durch den Magensaft.) Es ist leicht vorstellbar, daß im Pylorusbereich sozusagen eine andauernde Wiederanfärbung der Magenwand durch den dort stagnierenden, mit prontosilhaltigem Magensaft durchmischten Speisebrei erfolgt, die in dem von einer Gasblase ausgefüllten Fundusteil wegfällt. Inwieweit daneben eine

Differenz der Drüsenfunktion noch vorliegt, kann auf Grund makroskopischer Befunde nicht gesagt werden.

Außer durch den Magensaft wird auch auf dem Wege über die Gallensekretion dem Speisebrei ein gewisser Prozentsatz eines parenteral verabreichten Sulfonamids beigemischt. Und schließlich spielt auch das Pankreas dabei eine Rolle. Dadurch erscheint der Darminhalt nach Prontosilinjektion rot gefärbt. Während aber der Höhepunkt der Eigenfärbung des Darmes etwa nach 1 Stunde erreicht war, sah ich zu diesem Zeitpunkt noch keine Anfärbung des Darminhaltes. Erst nach 4—5 Stunden war eine intensive Rotfärbung desselben, besonders in den oberen Abschnitten des Dünndarmes, zu erkennen. Im Dickdarm und Rektum zeigte der Inhalt die übliche dunkle, braun-grüne Farbe, welche sich während der ganzen Versuchsreihe nicht wesentlich veränderte. Auch die Tingierung des Darmes selbst nahm von den oberen Abschnitten des Dünndarmes ihren Ausgang und blieb dort am längsten erhalten.

An den Mesenterien war nur eine eng lokalisierte Prontosilspeicherung nachweisbar. Während nämlich das Fettgewebe keine Färbung diffuser Art zeigte, war in der nächsten Umgebung der prall gefüllten Gefäße ein orangeroter Hof von verschiedener Breite erkennbar. Bei mikroskopischer Betrachtung (im Häutchenpräparat) verschwand dieser rote Streifen allerdings nach Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung sehr rasch, woraus man schließen kann, daß der Farbstoff nicht besonders im Gewebe fixiert war.

In der Literatur finden wir über dieses Verhalten des Fettgewebes keine einheitlichen Angaben. Während nämlich Marshall feststellte, daß Sulfonamide ins Fettgewebe kaum eindringen, konnten Janbon und seine Mitarbeiter bei Patienten, welche vor ihrem Tode basische Sulfonamide erhalten hatten, diese unter anderem auch im Fettgewebe nachweisen.

Bei den Kontrollversuchen mit Trypanblau war $^1/_2$ Stunde nach der Injektion eine ganz schwache Blaufärbung am Magen erkennbar. Der Dünndarm war etwas stärker gefärbt und auch die Mesenterien wiesen eine deutliche Anfärbung auf. Während im weiteren Verlauf der Versuche die Tingierung des Dünndarmes und der Mesenterien ziemlich rasch an Deutlichkeit zunahm, breitete sie sich am Magen besonders längs der kleinen Kurvatur aus, jedoch ging der Färbungsverlauf wesentlich langsamer vor sich. Die Färbung des Dickdarmes war infolge des durchscheinenden dunklen Inhaltes in ihrem Ablauf makroskopisch nicht so deutlich erkennbar. Nach etwa 8 Stunden war der gesamte Magen-Darmtrakt intensiv blau gefärbt. Die Entfärbung erfolgte im Laufe von 24 Stunden.

Leber, Milz und Pankreas (s. Abb. 7). Leber und Milz gehören zu der Gruppe von Organen, welche Sulfonamide aktiv speichern (vgl. Domagk, Janbon u. a.). Dementsprechend fand ich bei meinen Versuchen mit Prontosil in beiden Organen bereits $^1/_2$ Stunde nach der Injektion die höchsten Konzentrationen. Im Pankreas war das Maximum erst nach 1 Stunde erreicht. Während die Ausscheidung des

Prontosils in der Leber im Laufe der ersten Stunde ziemlich rasch, dann aber relativ langsam und gleichmäßig vor sich ging, zeigte die Entfärbungskurve bei Milz und Pankreas nach 4 Stunden einen neuerlichen leichten Anstieg, um im Anschluß daran analog zu der der Leber zu verlaufen.

Bei den Trypanblauversuchen waren Leber und Milz bereits nach 2 Stunden tief schwarzblau gefärbt und auch das Pankreas wies eine deutliche Blaufärbung auf. Der Höhepunkt lag — soweit dies bei der dunklen Eigenfarbe von Leber und Milz makroskopisch erkennbar war — bei etwa 6 Stunden, der übrige Färbungsverlauf entsprach dem der anderen Organe.

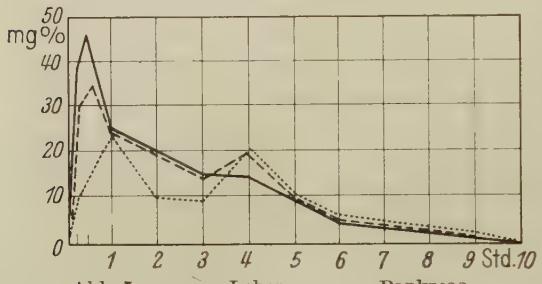


Abb. 7. ——— Leber, ····· Pankreas, – – – Milz.

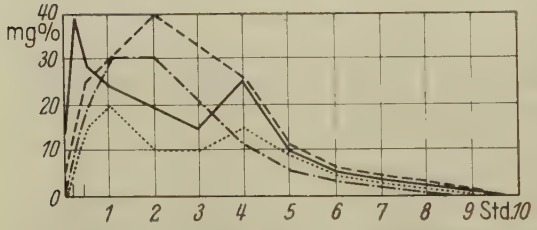


Abb. 8. ——— Niere, ····· Nebenniere, – – – Hoden, —·—·— Harnblase.

Urogenitaltrakt (siehe Abb. 8). Da die Hauptausscheidung des Prontosils bekanntlich auf dem Harnwege erfolgte, zeigte die Niere schon $^1/_4$ Stunde nach der Injektion ihre höchsten Werte, die nur um weniges geringer waren als die Maximalwerte der Leber. Bei der Harnblase waren die höchsten Werte nach 1—2 Stunden erreicht, dann fielen sie gleichmäßig und langsam wieder ab. Selbstverständlich steht die Färbung der Harnblase mit der Färbung des Urins in engstem Zusammenhang.

Über die Ausscheidung des Prontosils im Harn liegen in der Literatur zahlreiche Angaben vor (MARSHALL und Mitarbeiter, DOMAGK u. a.), so daß eine kolorimetrische Bestimmung in der vorliegenden Untersuchungsreihe nicht für nötig gefunden wurde.

An den Nebennieren waren im wesentlichen etwa halb so hohe Werte als an den Nieren feststellbar. Außerdem erfolgte der Anstieg der Kurve bis zur höchsten Konzentration langsamer als bei der Niere.

Am Hoden konnte ich eine sehr starke Färbung feststellen, die langsam zunahm, nach 2 Stunden ihr Maximum erreichte und dann wieder langsam absank. Diese Färbung war nicht immer gleichmäßig verteilt, an manchen Tieren zeigten die Hodenpole oder der Nebenhoden eine etwas dunklere Tingierung als die übrigen Abschnitte, doch konnte ich bei diesen Farbunterschieden keine Regelmäßigkeit heraus-

finden, so daß ich die kolorimetrischen Untersuchungen am ganzen Hoden (mit Nebenhoden und Anfangsteil des Samenleiters) anstellte.

Eine Ausscheidung von Sulfonamiden im Sperma konnte von Grütz und Krömer (zit. nach Domagk) nachgewiesen werden. (Eine Untersuchung des weiblichen Genitalapparates konnte nicht vorgenommen werden, da mir aus Zuchtgründen nur männliche Tiere zur Verfügung standen.)

Bei Färbung mit Trypanblau zeigten Niere und Nebenniere nach $^1/_2$ Stunde bereits eine leichte Tingierung, während bei Hoden und Harnblase 1 Stunde nach der Injektion noch keine Anfärbung erkennbar war. Der übrige Färbungsablauf war ohne Besonderheiten.

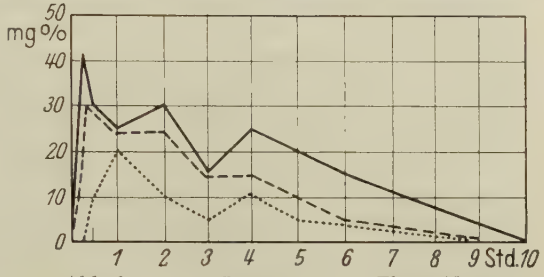


Abb. 9. ——— Lunge, ····· Thyreoidea, – – – Herz.

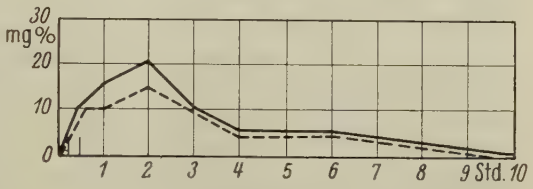


Abb. 10. ——— Großhirn, – – – Kleinhirn.

Lunge, Herz, Thyreoidea und *Thymus* (siehe Abb. 9). Im Gegensatz zu den Angaben von Janbon und seinen Mitarbeitern, welche in den Lungen der von ihnen untersuchten Patienten nur Spuren von basischem Sulfonamid fanden, konnte ich in der Lunge der mit Prontosil vitalgefärbten Ratten ziemlich hohe Werte (Maximum nach $^1/_4$ Stunde) und einen sehr langsamen Abfall derselben feststellen. Bei einem Versuchstier war sogar nach 10 Stunden noch eine deutliche Tingierung erkennbar.

Am Herzen zeigte der Färbungsverlauf keine Besonderheiten, der Höhepunkt der Kurve lag zwischen $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde, die Werte waren niedriger als bei der Lunge.

An der Thyreoidea ließ sich ein wesentlich langsamerer Anstieg und Abfall der Kurve erkennen. Die Werte lagen niedriger als die von Lunge und Herz.

An der Thymusdrüse konnte ich nur bei 4 Tieren eine Färbung feststellen, während bei den übrigen Versuchstieren entweder nur minimale Spuren oder überhaupt keine Tingierung nachweisbar waren. Dieser Befund hängt sicher mit den Umwandlungsvorgängen (Involution) der Thymusdrüse zusammen.

Bei der Färbung mit Trypanblau ergaben sich keine Besonderheiten. Herz und Lunge waren bereits nach $^1/_4$ Stunde sichtbar angefärbt, während die Blaufärbung von Thyreoidea und Thymus etwas langsamer vor sich ging.

Nervensystem (s. Abb. 10). Der Färbungsverlauf im Gehirn zeigte wesentlich langsameren Anstieg zu niedrigeren Werten als bei den

übrigen Organen. Das Maximum wurde erst nach 2 Stunden erreicht, wobei die Werte im Kleinhirn geringer waren als im Großhirn. Makroskopisch lokalisierte sich die Anfärbung vor allem im Bereich der Stammganglien, während die weiße Substanz keine wesentliche Tingierung erkennen ließ. Auch am peripheren Nervensystem (N. ischiadicus) war keine Rötung zu sehen. Analog den Ergebnissen von KASHARA und TARUMI konnte ich im Liquor nur ganz geringe Spuren von Prontosil feststellen. Eine Messung derselben war mit den mir zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich.

Bei den Kontrollversuchen mit Trypanblau zeigte sich 2 Stunden nach der Injektion die erste leichte Anfärbung (ebenfalls besonders in zentralen Partien des Gehirnes). Der weitere Färbungsverlauf war ohne Besonderheiten.

Überblick über die Untersuchungsergebnisse.

Wie aus den geschilderten Befunden hervorgeht, ist die Verteilung des Prontosils in den einzelnen Organen ziemlich verschieden. Trotzdem lassen die Untersuchungen 3 große Gruppen von Organen hinsichtlich der makroskopisch erkennbaren und kolorimetrisch meßbaren Speicherungsvorgänge feststellen.

Bei der ersten Gruppe erfolgte die maximale Speicherung schon innerhalb der ersten $^1/_2$ Stunde. Hierzu gehören außer dem subkutanen Bindegewebe Leber, Lunge, Niere und Milz. Wenn wir von letzterer absehen (denn die Milz nimmt — wie bei den übrigen Vorgängen im Gesamtorganismus — sicherlich gerade bei der Farbstoffspeicherung eine gewisse Sonderstellung ein), sind in dieser Gruppe alle Ausscheidungsorgane (besonders im chemischen Sinn) vereinigt. Sowohl die äußere Haut als auch Niere und Leber sind wichtige Faktoren bei der Sulfonamidausscheidung. Daß in diesen Organen (wie auch in der Lunge) eine gleichzeitige Speicherung der auszuscheidenden Stoffe stattfindet, und daß diese Speicherung sehr rasch nach der Applikation dieser Stoffe auftritt, ist leicht verständlich.

Zur zweiten Gruppe gehören die Organe, die zwar ebenfalls der Ausscheidung des Farbstoffes, aber erst in zweiter Linie, dienen (Magen-Darmtrakt, Schleimhäute und Drüsen), sowie jene Gewebe, in welchen der Farbstoff in größerem Maße gespeichert wird (Auge, Muskulatur, Knochen). Hier ist der Höhepunkt der Speicherung eine Stunde nach der Injektion.

In der dritten Gruppe schließlich sind die Organe vereinigt, in welchen die Speicherung langsamer erfolgt (Gehirn, Hoden) und welche die maximalen Werte erst 2 Stunden nach der Injektion erreichen.

Eine interessante Tatsache ist noch folgende: Bei einer Anzahl von Organen zeigte die Färbungskurve zwischen der dritten und vierten Stunde nach der Injektion einen neuerlichen Anstieg. Bei einer Reihe

anderer blieb das Niveau der Kurve in dieser Zeitspanne gleich. Zur ersten Gruppe gehören Niere, Nebenniere, Lunge, Milz, Pankreas, Thyreoidea und Muskelgewebe, zur zweiten Herz, Leber und die Organe des Verdauungstraktes. Da sich diese Befunde bei jeder der 4 Versuchsreihen mit Prontosil regelmäßig vorfanden, kann es sich wohl kaum um eine individuelle Abweichung oder sonstige Zufälligkeit handeln. Eine Deutung dieser in der Literatur bisher noch nicht erwähnten Tatsache dürfte allerdings nicht ganz leicht sein und muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung.

An 32 albinotischen Ratten wurden die Speicherungs- und Ausscheidungsvorgänge nach Vitalfärbung mit Prontosil solubile untersucht und kolorimetrisch bestimmt. Die Befunde wurden mit einer Reihe von Trypanblau-Vitalfärbungen verglichen.

Literatur.

Die mit * gekennzeichneten Arbeiten enthalten zusammenfassende Darstellungen oder ausführliche Literaturangaben.

Adams, A. E.: Science (N. Y.) **68** (1928). — Aiazzi-Mancini, L.: Sulfamidici Firenze. Vallecchi 1940. — Alexandrov, W.: Protoplasma (D.) **17** (1932). — Arnold, J.: Virchows Arch. **159** (1900). — Arch. mikrosk. Anat. **77** (1911). — Über Plasmastrukturen und ihre funktionelle Bedeutung. Jena 1914. — Barlow: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **37**, 315 (1937). — * de Beauchamps, P.: L'année biol. **11** (1906). — Becher, S.: Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne. Berlin 1922. — Becker, W. A.: Protoplasma (D.) **26** (1936). — Bickel: Le Sulfanilamide et ses derivés en thérapeutique. Lausanne: Payot 1940. — Blotevogel, W.: Z. Zellenlehre **1** (1924). — Boerner-Patzelt, W., A. Gödel u. Fr. Standenath: Das Retikuloendothel (Sammelbericht). Leipzig 1925. — Borell: Beitr. path. Anat. **65** (1919). — Bornstein, A. u. E. Rüter: Pflügers Arch. **207** (1925). — Carryer and Joy: J. Pharmacol. (Am.) **66** (1939). — Carter, W.: Science (N. Y.) **1939**, 394. — Cesaris-Demel, A.: Virchows Arch. **195** (1909). — Colombo, G.: Z. Mikrosk. **20** (1903). — Cowdry, E. V.: Internat. Mschr. Anat. u. Phys. **31** (1914). — Amer. J. Anat. **19** (1916). — Domagk, G.: Dtsch. med. Wschr. **1935**, 250. — * Domagk, G. u. C. Hegler: Chemotherapie bakterieller Infektionen. Leipzig 1944. — Dustin, P. jr.: Bull. Acad. Belg. Cl. Sci., V. s. **27**, 612 (1941). — * Efskind, L.: Acta med. scand. (Schwd.) **103** (1940). — Ehrlich, P.: Arch. mikrosk. Anat. (Bonn) **13** (1876). — Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885. — Dtsch. med. Wschr. **1886**. — Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. 1891. — Allg. med. Zentralztg. **1904**. — Feinstone u. Mitarb.: Vet. J. **95**, 77 (1939). — Fischel, A.: Z. Mikrosk. **25** (1908). — Untersuchungen über vitale Färbung von Süßwassertieren. Leipzig 1908. — * Vitale Färbung, In Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. 1910. — Fischer, A.: Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899. — * Forst, A. W.: Münch. med. Wschr. **1944**, Nr. 1/2. — Fürth, H. R.: Kolloid-Z. **37** (1925); **41** (1927). — Fürth, O. v.: Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie. Leipzig 1926. — Fuller: Lancet **1937** I, 194. — Fyg, W.: Z. Mikrosk. **45** (1928). — * Gaffron, H.:

Fschr. Zool., N. F. 1 (1936). – Garmus, A.: Z. Biol. 58 (1912). — Gellhorn, E.: Protoplasma (D.) 12 (1931); * 14 (1932). — Gerlach, J.: Mikroskopische Studien aus dem Gebiete der menschlichen Morphologie. Erlangen 1858. — Gersch, M.: Protoplasma (D.) 27 (1937). — Gicklhorn, J.: Kolloid-Z. 42 (1927/29). — * Erg. Biol. 7 (1931). — * Protoplasma (D.) 2 (1927). ; 13 (1931. — * Erg. Physiol. 31 (1931). — Biol. Zbl. 51 (1931). — Gicklhorn u. Mitarb.: Arch. exper. Zellforsch. 1 (1923). — Z. Zellforsch. 2 (1925). — Protoplasma (D.) 2 (1927); 13 (1931). — Giroud, A.: Protoplasma (D.) 12 (1931). — Giroud u. Mitarb.: Arch. Anat. mikrosk. 34 (1935). — Glasunow, M.: Z. Zellforsch. 6 (1928). — Goldmann, E.: Beitr. klin. Chir. 64 (1909). — Neue Untersuchungen über die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Tübingen 1912. — Abh. preuß. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. 1913. — Golowin, E.: Z. Mikrosk. 19 (1902). — Gräper, L.: Arch. Entw. mechan. 33 (1911). — Anat. Anz. 81, Erg.-H. (1936). — Gray, J.: A Textbook of Experimental Cytology. Cambridge 1931. — * Gutstein, M.: Z. exper. Med. 82 (1932). — de Haan, J. u. Mitarb.: Arch. exper. Zellforsch. 5 (1928). — Hackmann, Chr.: Medizin und Chemie, Bd. IV. 1942. — Hecht: Derm. Wschr. 1938. — Heilbrunn, L. V.: Protoplasma-Monographien, Bd. 1. 1928. — Heringa, G. C.: Die Herstellung mikroskopischer Dauerpräparate. In Methodik der wissenschaftlichen Biologie. 1928. — Hertwig, G.: Allgemeine mikroskopische Anatomie und Organisation der lebendigen Masse. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. 1929. — Herzfeld, E.: Anat. H. 64 (1917). — Heubner: Klin. Wschr. 1940, 265, 289. — Hirsch, G. Ch.: Arch. Entw.mechan. 123 (1931). — Z. Zellforsch. 14 (1931); 15 (1932). — Protoplasma-Monographien, Bd. 18. 1939. — Hirsch u. Mitarb.: Z. Zellforsch. 3 (1926). — Höber, R.: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1926. — Höber u. Mitarb.: J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 15 (1940). — Hörlein: Royal Soc. London 3. Okt. 1936. — Hollborn, K.: Z. Mikrosk. 54 (1937). — Hug: C. r. Soc. Biol. 134, 163 (1940). — Janbon u. Mitarb.: Presse méd. 50 (1942). — Jeffers, K. R.: J. Morph. (Am.) 56 (1934). — Kagan, M.: Z. Zellforsch. 5 (1927); 9 (1929); 14 (1932). — Kamnev, J. E.: Protoplasma (D.) 21 (1934). — Karrer, P.: Lehrbuch der organischen Chemie. Leipzig 1943. — Kashara u. Tarumi: Klin. Wschr. 1938, 354.— Kedrowsky, B.: Z. Zellforsch. 15 (1932); 22 (1935). — Bull. Histol. appl. etc. 11 (1934). — Keller, R. u. J. Gicklhorn: Methoden der Bioelektrostatik. In Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. 1928. — Erg. Physiol. 30 (1930). — Kiyono, K.: Die vitale Karminspeicherung. Jena 1914. — Kiyono u. Mitarb.: Acta Scholae med. Kyoto 20 (1937). — * Die Lehre von der Vitalfärbung. Kyoto 1938. — Klein, G.: Allgemeine und spezifische Methodik der Histochemie. In Methodik der wissenschaftlichen Biologie. 1928. — Praktikum der Histochemie. Wien u. Berlin 1929. — Klein u. Mitarb.: Fortschritte der Mikrochemie in ihren verschiedenen Anwendungsgebieten. Wien 1928. — Koehring, V.: J. Morph. a. Physiol. (Am.) 49 (1930). — Kollath, W.: Klin. Wschr. 1929, 8. Kono, T.: Protoplasma (D.) 11 (1930). — Kraft I. Z. Zellforsch. 1 (1924); 25 (1937). — Laves, W.: Virchows Arch. 279 (1930). — Lehmann, F. E.: Verh. dtsch. Zool. Ges., 32. Jahresverslg. München 1928. — Lehnartz, E.: Einführung in die chemische Physiologie. Berlin 1937. — Lepper, L.: Z. Zellforsch. 2 (1925). — Lewis, W. H., u. M. R.: Amer. J. Anat. 17 (1915). — * Lison, L.: Ann. Soc. Sci. méd. et natur. Brux. 1/2 (1933). — Bull. Acad. Mir. Belg., Sci. Brux. 19 (1933). — Protoplasma (D.) 24 (1935). — C. r. Soc. Biol. 118 (1935). — * Liege med. 1935, Nr 22. — Histochimie animale. Paris 1936. — Bull. Acad chir. Belg., Brux. 22 (1936). — J. Physiol. (Brit.) 90 (1937). — * Arch. Biol. (Fr.) 51 (1940). — Long and Bliss: The clinical use of sulfonamide. New York 1939. — Lucas

and Mitchell: Canad. med. Assoc. J. **40** (1939). — Ludford, R. J.: Proc. roy. Soc., Lond. **1** 4 (1930). — Luyet, B.: Science (N. Y.) **85** (1937). — Macallum, A. B.: Erg. Physiol. **8** (1908). — Die Methoden der biologischen Mikroanalyse. In Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. 1912. — Marshall: Science (N. Y.) **1938**. — Physiol. Rev. (Am.) **19** (1939). — Dental Items (Am.) **63** (1941). — Marshall u. Mitarb.: Science (N. Y.) **85** (1937). — Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **36** (1937). — J. amer. med. Assoc. **108** (1937). — Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **63** (1938). — Science (N. Y.) **1938**. — J. Pharmacol. (Am.) **61** (1938); **67** (1939). — Maximow, A. A., and W. Bloom: A textbook of histology. Philadelphia a. London 1943. — McKee u. Mitarb.: Science (N. Y.) **98** (1937). — Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **42** (1939). — Michaelis, L.: Arch. mikrosk. Anat. (Bonn) **55** (1900). — Einführung in die Farbchemie für Histologen. Berlin 1902. — Arch. mikrosk. Anat. **94** (1920). — Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1922. — Mietsch: Ber. dtsch. chem. Ges. **71** (1938). — Miranda: Zit. nach Domagk. — Mitamura, T.: Zbl. Path. **33** (1923). — Möllendorff, W. v.: Verh. anat. Ges. **1913**. — Anat. H. **53** (1915). — Kolloid-Z. **18** (1916). — Arch. mikrosk. Anat. (Bonn) **99** (1918). — Erg. Physiol. **18** (1920). — Arch. mikrosk. Anat. (Bonn) **97** (1923). — Münch. med. Wschr. **1923**, Nr 29. — Derm. Wschr. **1923**, Nr 49/50. — Farbenanalytische Untersuchungen. In Handbuch der Biochemie der Menschen und der Tiere. Jena 1925. — Vitale Färbung. In Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. Berlin u. Wien 1926. — * Methoden zu Studien über vitale Färbung an Tierzellen. In Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Berlin 1928. — * Monné, L.: Protoplasma (D.) **30** (1938). — Z. Mikrosk. **55** (1938). — Arch. exper. Zellforsch. **24** (1942). — Nagel, A.: Farbenanalytische Untersuchungen. In Handbuch der Biochemie der Menschen und der Tiere, Erg-W. Jena 1933. — Nassonov, D. N.: Z. Zellforsch. **3** (1926). — Protoplasma (D.) **17** (1932). — Needham, J.: Chemical Embryology. Cambridge University Press 1931. — * Nierenstein, E.: Pflügers Arch. **179** (1920). — * Noll, A.: Erg. Physiol. **35** (1933). — P'an: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **46** (1941). — Pappenheim, A.: Grundriß der Farbchemie. Berlin 1901. — Petersen, H.: Histologie und mikroskopische Anatomie, München 1935. — * Pfeiffer, H.: Protoplasma (D.) **8** (1929/30). — Pfuhl, W.: Z. Zellforsch. **15** (1931). — Z. Anat. u. Entw.gesch. **110** (1940). — Pinkhof: Zit. nach Domagk. — * Pischinger, A.: Z. Zellforsch. **3** (1926).; **5** (1927). — Raiziss and Severac: J. Chemother. (Am.) **14**, 91 (1938). — Regoli: Boll. Ocul. **20**, 21 (1941). — Rass. ital. Ottalm. **10** (1941). — Ries, E.: Verh. dtsch. zool. Ges. **1933**; * **1936**. — Z. Zellforsch. **22** (1935); **26** (1937). — * Biologe **6** (1937). — Ries, E., u. M. Gersch: Z. Zellforsch. **25** (1936). — * Romeis, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 1943. — * Histochemische Methoden. In Methodik wissenschaftlicher Biologie. Berlin 1928. — Roskin, G., u. A. Maslowa: Z. Mikrosk. **52** (1935). — Rost, F.: Pflügers Arch. **137** (1911). — Rumyantzew, A. u. B. Kedrowsky: Protoplasma (D.) **1** (1926/27). — Saleind, S.: Protoplasma (D.) **6** (1929). — Scheie u. Sonders: Arch. Ophthalm. (D.) **25** (1941). — Schilling, K.: Arch. exper. Zellforsch. **18** (1935/36). — Schlottke, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **28** (1932). — Schönholzer: Klin. Wschr. **1940**, 790. — * Schulemann, W.: Kolloid-Z. **20** (1917). — * Biochem. Z. **80** (1917). — * Vitalfärbung. In Tabulae Biologica, 4. Berlin 1927. — * Seemann, G.: Z. Mikrosk. **47** (1930). — * Seki, M.: Fol. anat. jap. **10** (1932); **11** (1933). — Z. Zellforsch. **18** (1933); **19** (1933); **23** (1936). — Snook, Th.: Stein Technol. **14** (1939). — Spek, J.: Erg. Enzymforsch. **6** (1937). — Spek, J., u. R. Chambers: Protoplasma (D.) **20** (1934). — Steckelmacher, S.: Frankf. Z. Path. **21** (1918). — Stelzer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194** (1940). — Steudel, H., u. S. Ossato: Hoppe-Seylers Z. **124**

(1923). — Stewart, Rourke and Allan: J. amer. med. Assoc. **110** (1938). — * Strugger, S.: Arch. exper. Zellforsch. **19** (1937). — Tellyesniczky, K. v.: Arch. mikrosk. Anat. **60** (1902). — Fixation. In Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, Berlin u. Wien 1926. — Turkell u. Mitarb.:Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **47** (1941). — Uschin, N. P.: Arch. Entw.mechan. **106** (1925). — Vonwiller, F.: Intravitale Färbung von Protozoen. In Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. 1921. — Verh. anat. Ges. **57**, Erg.H. (1923). — * Vitalfärbung. In Methoden der wissenschaftlichen Biologie. 1928. — Bruns' Beitr. **149** (1929). — Wallbach, G.: Z. Zellforsch. **13** (1931). — Wankell, F.: Ber. Naturforsch. Ges. **23** (1921). — Wassiljeff, A.: Z. Zellforsch. **2** (1925). — Wentzlaff, A.: Z. Zellforsch. **1** (1924). — Westblad, E.: Zool. Anz. **59** (1924). — Wizinger: Organische Farbstoffe. 1933. — Wood, J. K.: Chemistry of Dyeing. London 1926. — Yamasaki, M.: Arb. anat. Inst. Sendai **16** (1934). — Zeiger, K.: Z. Zellforsch. **10** (1930). — Die Methoden der histologischen Technik vom Standpunkt der Kolloidlehre. In Medizinische Kolloidlehre. Dresden u. Leipzig 1935. — * Z. Zellforsch. **22** (1935). — * Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden u. Leipzig 1938.

Dr. E. Kleiss, München, Anatom. Inst. d. Univ.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 29—38 (1949).

Aus dem Physiologischen und allgemeinen Pathologischen Institut der Universität Debrecen (Direktoren: Prof. Dr. S. Went und Prof. Dr. L. Kesztyüs).

Die „cortinähnliche" Wirkung des g-Strophanthins.

I. Mitteilung.

Von

E. Varga, D. Bagdy und L. Kesztyüs.

(Eingegangen am 27. November 1948.)

Zwemer und Mitarbeiter[1] haben vor kurzer Zeit an Katzen, Ratten und Mäusen festgestellt, daß an normalen Tieren zum Tode führende intravenöse KCl-Dosen mit gleichzeitig gegebenen toxischen Mengen des Strophanthins gut ertragen werden. Es wurde weiter gezeigt, daß g-Strophanthin — ein Glykosid mit steroider Struktur — den Kaliumspiegel des Serums, ebenso wie das Nebennierenrindenextrakt, über viele Stunden senkt und daß das Strophanthin an nebennierenlosen Tieren das Cortin ersetzen kann. Zur Erläuterung dieser Beobachtungen haben die Verfasser die Vermutung ausgedrückt, daß der eigentlich wirksame Stoff der Nebennierenrinde ein Glykosid wäre. Es wurde versucht, Glykoside mit steroider Struktur aus den Nebennieren zu isolieren; einer dieser isolierten Stoffe schien, an das Sterinskelett gebunden, eine Kohlenhydratseitenkette (Askorbinsäure) zu enthalten.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Tod von Mäusen infolge von Insulinkrämpfen durch vorangehende Strophanthin-Injektionen verhindert und der Blutzuckerwert normaler Katzen durch Verabreichung dieses Herzglykosides gehoben werden kann. Auch diese Wirkungen des Strophanthins sind mit derjenigen der Nebennierenrindenextrakte gut vergleichbar.

Wir wollen hier die Frage beantworten, welche Einflüsse das Strophanthin auf den Mineralsalz- und Kohlenhydrathaushalt normaler Organismen hat und wie weit diese Wirkungen mit den Cortineffekten identifiziert werden können. Es ist nämlich klar, daß durch die obenerwähnten Beobachtungen von Zwemer und Mitarbeitern die cortinähnlichen Wirkungen des Strophanthins noch keinesfalls bewiesen sind. Systematische Kontrolluntersuchungen sind — nach unserer Meinung — um so mehr nötig, da Dorfman[2] kurz nach den Publikationen von Zwemer über eine Serie von 140 Mäusen berichtet hat, die nach doppelseitiger Nebennierenexstirpation täglich mit verschiedenen Dosen von Strophanthin behandelt waren, ohne die Lebensdauer der behandelten Tiere gegenüber der der Kontrollen verlängern zu können.

Aus diesem Grunde lehnt Dorfman die Möglichkeit einer Wirkungsparallelität zwischen Cortin und Strophanthin ab.

Die erste Reihe unserer Versuche wurde an Kaninchen durchgeführt. Wir untersuchten den Einfluß von 50—75 γ/kg Strophanthin — 2 Tage lang intravenös injiziert — auf den Blutchlorid-, Natrium- und Kaliumspiegel und auf den Blutzucker. Die angewendeten Strophanthinmengen sind ziemlich groß; nach Zwemer sind aber erst diese hohen Dosen imstande, eine cortinähnliche Wirkung zu entfalten. Das Blutchlorid wurde nach Ruszнyák[3] bestimmt. Die normalen Chloridwerte der Tiere haben wir zuerst mehrere Tage lang kontrolliert. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1.

Zeit der Bestimmung	Serumchlor mg-%		
	Kaninchen Nr. 1, ♂ 2000 g	Kaninchen Nr. 2, ♂ 1840 g	Kaninchen Nr. 3, ♂ 1950 g
3. 6. 46			
8 Uhr	171	238	224
10 Uhr	171	238	224
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	214	—	237
12 Uhr	214	244	259
13 Uhr	224	255	270
14 Uhr	207	—	—
15 Uhr	214	284	270
16 Uhr	214	—	—
17 Uhr	—	308	280
18 Uhr	211	—	—
19 Uhr	—	322	—
4. 6. 46			
8 Uhr	174	291	255
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
9 Uhr	288	266	266
11 Uhr	254	287	280
13 Uhr	—	305	280
15 Uhr	—	316	287
5. 6. 46			
8 Uhr	—	327	380

Wie ersichtlich ist, wird der Chloridspiegel auf Strophanthin am ersten Tage um 15—30%, am zweiten Tage um 35—78% erhöht.

Das Blutnatrium und Kalium wurde nach Kramer und Tisdall bestimmt (Tabelle 2 und 3).

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, bringt das Strophanthin am ersten Tage eine 15—36%ige, am zweiten Tage eine 40—73%ige Zunahme der Blutnatriumwerte hervor.

Tabelle 2.

Zeit der Bestimmung	Serum-Na mg-%		
	Kaninchen Nr. 4, ♂ 1560 g	Kaninchen Nr. 5, ♂ 2420 g	Kaninchen Nr. 6, ♂ 2810 g
7. 6. 46			
8 Uhr	217	256	161
10 Uhr	217	256	161
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	—	281	220
12 Uhr	225	—	199
13 Uhr	—	281	—
14 Uhr	240	—	—
15 Uhr	—	285	167
17 Uhr	252	—	152
19 Uhr	—	281	—
8. 6. 46			
8 Uhr	215	256	236
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
9 Uhr	—	315 .	—
10 Uhr	305	—	279
12 Uhr	300	308	243
14 Uhr	—	365	248
16 Uhr	—	313	230
9. 6. 46			
8 Uhr	250	237	206

Tabelle 3.

Zeit der Bestimmung	Serum-K mg-%		
	Kaninchen Nr. 7, ♂ 1720 g	Kaninchen Nr. 8, ♂ 1860 g	Kaninchen Nr. 9, ♂ 2570 g
15. 6. 46			
8 Uhr	29	39	35
10 Uhr	29	39	35
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	—	29	24
12 Uhr	24	—	24
14 Uhr	27	—	—
15 Uhr	—	30	17
17 Uhr	30	30	17
16. 6. 46			
8 Uhr	26	33	27
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
10 Uhr	—	25	23
12 Uhr	25	—	23
13 Uhr	—	22	—
15 Uhr	—	20	—
17 Uhr	-	18	—
16. 6. 46			
8 Uhr	--	31	22

Tabelle 4.

Zeit der Bestimmung	Blutzucker mg-%		
	Kaninchen Nr. 10, ♂ 2350 g	Kaninchen Nr. 11, ♂ 1650 g	Kaninchen Nr. 12, ♂ 2015 g
3. 7. 46			
8 Uhr	114	94	93
10 Uhr	114	94	93
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	132	132	87
12 Uhr	160	—	118
13 Uhr	140	94	102
15 Uhr	125	94	—
17 Uhr	—	92	83
4. 7. 46			
7 Uhr	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
8 Uhr	147	103	162
9 Uhr	163	—	193
10 Uhr	—	—	277
11 Uhr	202	156	—
12 Uhr	—	157	302
14 Uhr	—	112	185
16 Uhr	—	98	—
5. 7. 46			
8 Uhr	—	81	130

Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Plasmakaliumwerte.

Die Kaliumkonzentration nimmt am ersten und auch am zweiten Tage um 14—52% ab.

Tabelle 4 gibt das Verhalten des Blutzuckers wieder.

Wie daraus ersichtlich ist, tritt eine Erhöhung der Werte am ersten Tage um 26—40%, am zweiten Tage um 40—230% ein. In einem Versuch konnten wir am zweiten Versuchstage neben der Hyperglykämie auch Glykosurie beobachten. Im Harne des Kaninchens 12 (Gesamtmenge 56 cm^3) haben wir 3,4 g Zucker nachgewiesen.

Ähnliche Versuche wurden auch an Hunden durchgeführt. Den Tieren wurden 50—100 γ Strophanthin je Körpergewichtskilogramm während 2 Tagen intravenös injiziert. Blutchloridwerte sind auf Tabelle 5, Blutnatriumwerte auf Tabelle 6, Serumkaliumwerte auf Tabelle 7, Blutzuckerwerte auf Tabelle 8 wiedergegeben.

Wie ersichtlich, erhöht sich der Chloridspiegel auch an Hunden mit 10—20%; die Steigerung ist also etwas mäßiger als an Kaninchen. Die Konzentration des Serumnatriums nimmt auf Strophanthin um 10—50% zu, die des Serumkaliums um 40—80% ab.

Die Wirkung des Strophanthins wird also an Kaninchen in erster Linie durch eine Steigerung der Serumnatrium- und Chloridkonzen-

tration charakterisiert, während sich an Hunden die durch das Strophanthin hervorgerufenen Salzhaushaltgleichgewichtsstörungen eher in einer Abnahme der Blutkaliumkonzentration manifestieren.

Tabelle 5.

Zeit der Bestimmung	Serumchlor mg-%		
	Hund Nr. 1, ♂ 9,8 kg	Hund Nr. 2, ♂ 15 kg	Hund Nr. 3, ♂ 13 kg
20. 7. 46			
8 Uhr	277	271	270
10 Uhr	277	271	270
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	90 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	280	284	288
12 Uhr	280	273	302
13 Uhr	284	273	—
14 Uhr	—	—	305
15 Uhr	298	280	—
16 Uhr	—	—	269
17 Uhr	298	291	—
19 Uhr	302	312	—
21. 7. 46			
8 Uhr	263	295	284
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
9 Uhr	263	316	284
10 Uhr	280	327	276
11 Uhr	291	313	298
13 Uhr	294	305	305
15 Uhr	—	288	326
16 Uhr	302	284	—
19 Uhr	284	—	—
22. 7. 46			
8 Uhr	284	291	294

Wie aus der Tabelle 8 ersichtlich ist, verursachte das Strophanthin, gegenüber der an Kaninchen beobachteten Hyperglykämie, an Hunden eine leichte *Abnahme* des Blutzuckers. Zur Erläuterung dieser entgegengesetzten Ergebnisse sei auf die Untersuchungen von Rowinsky [4] hingewiesen, der bezüglich der Blutzuckerregulation von Hunden und Kaninchen einen analogen Unterschied beobachtete. Rowinsky hat nämlich festgestellt, daß die intravenöse Einspritzung von Nabutyrat an Kaninchen eine Blutzuckererhöhung bewirkte, wogegen die gleiche Menge von Natriumbutyrat an Hunden die Blutzuckerkonzentration um 30—40% herabsetzte. Rowinsky hat diese entgegengesetzten Ergebnisse mit der Annahme erklärt, daß im intermediären Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel von Hunden und Kaninchen wesentliche Differenzen bestehen.

Zur Ergänzung der an Hunden durchgeführten Untersuchungen haben wir nach der biologischen Cortinwertbestimmungsmethode von West[5] und Hartmann[6] die im Harne täglich ausgeschiedenen K-,

Tabelle 6.

Zeit der Bestimmung	Serum-Na mg-%		
	Hund Nr. 4, ♂ 9,5 kg	Hund Nr. 5, ♂ 13,2 kg	Hund Nr. 6, ♂ 5,5 kg
3. 8. 46			
8 Uhr	306	282	267
10 Uhr	306	282	267
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	90 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	313	272	341
12 Uhr	334	314	321
13 Uhr	—	305	—
14 Uhr	324	—	355
15 Uhr	—	360	—
16 Uhr	314	—	308
17 Uhr	—	346	—
19 Uhr	313	332	—
4. 8. 46			
8 Uhr	285	305	256
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	—
9 Uhr	371	333	
10 Uhr	307	—	
11 Uhr	293	333	
13 Uhr	286	333	
20 Uhr	296	316	
5. 8. 46			
8 Uhr	304	310	

Na- und Chloridmengen bestimmt. Die Hunde wurden mit konstanter Diät aus Hundekuchen gefüttert. Wir haben auf das korrekte Sammeln und auf die tägliche präzise Abgrenzung des Urins sorgfältig geachtet. Nach einer 4tägigen Vorperiode wurde Strophanthin verabreicht und die mit dem Harn ausgeschiedenen Elektrolytmengen 4 Tage lang bestimmt. Den Verlauf eines derartigen Versuches gibt die Tabelle 9 wieder.

Wie aus der Tabelle 9 ersichtlich ist, wird die im Harne ausgeschiedene Cl-Menge durch Strophanthin nicht wesentlich beeinflußt. Sie ist im allgemeinen ziemlich schwankend. Eindeutiger ist das Verhalten von Na und K. Die mit dem Harn ausgeschiedenen Natriummengen sanken in allen Versuchen am zweiten Tage ungefähr um die Hälfte herab, das Strophanthin bewirkt also eine 40—50%ige Natriumretention. Demgegenüber nimmt die Kaliumausscheidung durch Verabreichung von Strophanthin ungefähr 8—10mal zu.

Tabelle 7.

Zeit der Bestimmung	Serum-K mg-%		
	Hund Nr. 7, ♂ 7,5 kg	Hund Nr. 8, ♂ 10,5 kg	Hund Nr. 9, ♂ 15,0 kg
20. 8. 46			
8 Uhr	19	46	29
10 Uhr	19	46	29
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	85 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	12	43	29
12 Uhr	13	25	18
13 Uhr	18	21	
14 Uhr	—	—	19
15 Uhr	19	17	
16 Uhr	—	—	14
17 Uhr	19	24	13
19 Uhr	11	10	—
21. 8. 46			
8 Uhr	19	46	23
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
9 Uhr	15	21	18
10 Uhr	14	—	15
11 Uhr	14	—	—
13 Uhr	9	—	—
15 Uhr	10	—	15
17 Uhr	—	9	—
22. 8. 46			
8 Uhr	19	40	28

Tabelle 8.

Zeit der Bestimmung	Blutzucker mg-%		
	Hund Nr. 10, ♂ 8,0 kg	Hund Nr. 11, ♂ 8,8 kg	Hund Nr. 12, ♂ 14,5 kg
3. 9. 46			
8 Uhr	79	83	73
10 Uhr	79	83	73
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	85 γ Strophanthin/kg intravenös
11 Uhr	68	68	69
12 Uhr	79	65	69
13 Uhr	85	61	61
15 Uhr	63	62	66
18 Uhr	81	74	67
4. 9. 46			
8 Uhr	81	85	70
	50 γ Strophanthin/kg intravenös	75 γ Strophanthin/kg intravenös	100 γ Strophanthin/kg intravenös
9 Uhr	61	61	51
10 Uhr	67	69	54
11 Uhr	67	69	56
13 Uhr	65	69	58
15 Uhr	65	79	60
5. 9. 46			
8 Uhr	75	79	69

Tabelle 9. *Hund Nr. 13. 15,0 kg.*

Zeit der Versuchen	Harnmenge	Cl		Na		K	
		g	mg-%	g	mg-%	g	mg-%
	cm³	im 24stündigen Harn					
1946							
16. 6. 8 Uhr bis 17. 6. 8 Uhr	830	1,95	234	1,90	229	0,48	58
17. 6. 8 Uhr bis 18. 6. 8 Uhr	550	1,31	288	2,00	364	0,46	83
18. 6. 8 Uhr bis 19. 6. 8 Uhr	710	2,48	350	2,06	290	0,41	58
19. 6. 8 Uhr bis 20. 6. 8 Uhr	840	2,62	312	2,13	254	0,40	47
20. 6. 8 Uhr		75 γ/kg Strophanthin intravenös					
20. 6. 8 Uhr bis 21. 6. 8 Uhr	1200	2,62	219	1,24	104	1,28	107
21. 6. 8 Uhr		50 γ/kg Strophanthin intravenös					
21. 6. 8 Uhr bis 22. 6. 8 Uhr	1370	2,22	162	0,98	72	4,18	305
22. 6. 8 Uhr bis 23. 6. 8 Uhr	980	1,99	201	1,61	165	1,58	161
23. 6. 8 Uhr bis 24. 6. 8 Uhr	1040	2,59	240	2,19	211	0,44	42
24. 6. 8 Uhr bis 25. 6. 8 Uhr	670	2,42	361	2,29	341	0,51	76

Diskussion.

Am Grunde der obenerwähnten Beobachtungen ist es unzweifelhaft, daß das Strophanthin eine Steigerung der Serumnatriumkonzentration und eine Senkung der durch den Harn ausgeschiedenen Natriummenge bewirkt und daß dieser Effekt mit der durch das Nebennierenrindenhormon verursachten Natriumretention übereinzustimmen scheint. Auch die Tatsache, daß der Kaliumgehalt im Plasma ab-, im Harne dagegen zunimmt, weist darauf hin, daß das Strophanthin und das Nebennierenrindenhormon ähnliche Wirkungen haben. Auch die an Kaninchen festgestellte Blutzuckersteigerung — abgesehen von der in einem Versuch beobachteten extrem hohen Hyperglykämie und Glykosurie — stimmt damit überein, daß der Blutzuckerwert der normalen Tiere durch Verabreichung des Rindenhormons über die Norm gehoben werden kann.

Im Lichte dieser Beobachtungen scheint es wohl möglich zu sein, bei nebennierenlosen Tieren das Cortin durch Strophanthin ersetzen zu können. Bezüglich der Feststellungen von Dorfman möchten wir auf die bekannte Tatsache hinweisen, daß die Verabreichung von Natriumchlorid in der Behandlung nebenniereninsuffizienter Kranken und adrenalektomierter Tieren zweifellos günstige Folgen hat. Eine vollständig befriedigende Erklärung dieser lebenserhaltenden NaCl-Wirkung fehlt noch, wahrscheinlich ist jedoch, daß durch Kochsalzsättigung vor allem der Wassergehalt des Blutplasmas, also das Blutvolumen und dadurch auch der Kreislauf aufrecht erhalten wird. Es ist aber gleichgültig, ob der erhöhte Natriumgehalt im Plasma durch von außen eingeführtes Kochsalz verursacht wird oder ob das NaCl des Organismus selbst die Natriumkonzentration des Blutes steigert. Neben der Steigerung des Plasmanatriumgehaltes ist aber

auch die Abnahme des Plasmakaliums wichtig. KENDALL hat, wie bekannt, hervorgehoben, daß adrenalektomierte Hunde auf NaCl-Behandlung nur dann dauernd gesund bleiben, wenn der Kaliumgehalt der Nahrung niedrig ist. Die Feststellung von ZWEMER — daß das Strophanthin allein imstande ist, adrenalektomierte Tiere am Leben zu erhalten —, scheint uns gut begründet zu sein.

Man kann aber aus solchen Beobachtungen nicht ohne weiteres darauf schließen, daß das Strophanthin tatsächlich eine cortinähnliche Wirkung hat. Sie bestätigen nur die alte Annahme, daß der Überlebenstest zur Beurteilung der Rindenhormonwirkungen nicht vollkommen geeignet ist. Man kann z. B. nebennierenlose Tiere mit Kochsalzzulagen lange Zeit hindurch in gutem Zustande erhalten, es wird aber heute selbst von den Begründern der Kochsalztherapie nicht mehr behauptet, daß sie das Nebennierenrindenhormon *ersetzen* könne. Unsere oben geschilderten Versuchsresultate und auch die im Überlebenstest gewonnenen Ergebnisse von ZWEMER hätten die cortinähnliche Wirkung des Strophanthins nur dann bewiesen, wenn behauptet werden könnte, daß das Strophanthin den Salzhaushalt und die Lebensdauer — wie das Nebennierenrindenhormon — durch die Phosphorylierungsprozesse beeinflußt. So lange experimentelle Beobachtungen fehlen, wie weit das abgesunkene Phosphorylierungsvermögen adrenalektomierter Tiere durch Strophanthin normalisiert werden kann, sind wir nicht berechtigt, über „cortinähnliche" Wirkungen desselben zu sprechen.

Zusammenfassung.

An normalen Kaninchen bewirkten höhere Dosen des Strophanthins eine Steigerung des Blutchlorid-, Natrium- und Zuckerspiegels und eine Erniedrigung der Plasmakaliumkonzentration. An normalen Hunden wird der Chlorid- und Natriumgehalt des Blutes auf Strophanthin erhöht, der Kaliumgehalt des Plasmas gesenkt. Die mit dem Harn ausgeschiedenen Natriummengen sanken nach Strophanthinbehandlung ab und gleichzeitig nahm die Kaliumausscheidung stark zu. Im Lichte dieser auf den Salzhaushalt entfaltenen Strophanthinwirkungen scheint uns die Feststellung von ZWEMER — daß das Strophanthin allein imstande ist, adrenalektomierte Tiere am Leben zu erhalten — gut begründet zu sein. Solange aber experimentelle Beobachtungen fehlen, ob das Strophanthin den Salzhaushalt normaler und die Lebensdauer adrenalektomierter Tiere — wie das Nebennierenrindenhormon — durch die *Phosphorylierungsprozesse* beeinflußt, sind wird nicht berechtigt, über „cortinähnliche" Wirkung von Herzglykosiden zu sprechen.

Summary.

Experiments on rabbits and dogs have shown, that by administration of g-strophanthin the potassium concentration of blood decreases, that of sodium increases. Accordingly, a reduced amount of sodium and an increased amount of potassium has been found in the urine. The blood chlorid and sugar level of rabbits is augmented by g-strophanthin. The hyperchloremy in dogs is less pronounced and the blood sugar level tends to decline. Because of the unstability of chloride excretion it was impossible to ascertain any charakteristic changes in the chloride content of the urine on g-strophanthin administration. The action of g-strophanthin on the salt metabolism seems to corroborate the view of Zwemer et al that on adrenalectomized animals the life prolonging effect of g-strophanthin is based on its cortin like action.

Literatur.

[1] Zwemer, R. L., B. E. Löwenstein and K. L. Pines: Endocrinology (Am.) **27**, 945 (1940). — Zwemer, R. L., K. L. Pines and B. E. Löwenstein: Science (N. Y.) **1940**, 600. — Zwemer, R. L., and B. E. Löwenstein: Science (N. Y.) **1940**, 75. — [2] Dorfman, R. I.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **43**, 489 (1940). — [3] Rusznyák, St.: Biochem. Z. **114**, 23. — [4] Rowinski, P.: Ormoni **4**, 209 (1942). — [5] West, G. B.: Quart. J. Pharmacy **14**, 26 (1941). — [6] Hartmann: Endocrinology (Am.) **26**, 871, 879 (1940); **27**, 287 (1940); **30**, 861 (1942); **31**, 287 (1942).

Dr. E. Varga, Debrecen, Physiologisches und allgemein Pathologisches Institut der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 39—54 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über die Kaliumabgabe des Froschmuskels bei Einwirkung kontrakturerzeugender Stoffe und die Hemmung der Kaliumabgabe durch kontrakturverhütende Lokalanästhetika*.

Von

Annemarie Hardt und Albrecht Fleckenstein.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. September 1948.)

A. Einleitung und Fragestellung.

Durch zahlreiche Arbeiten verschiedener Autoren ist gesichert, daß die quergestreifte Muskelfaser bei jeder Kontraktion Kaliumionen nach außen abgibt (Fenn und Mitarbeiter[1], Reginster[2], Wood, Collins und Moe[3], Somogyi und Verzár[4]) und dafür eine äquivalente Menge von Natriumionen aufnimmt (Fenn und Mitarbeiter[1], Tipton, Steinbach[6] u. a.). Dieser Kationenaustausch ist an isolierten Froschmuskeln ebenso wie an Muskeln in situ bei Ratten, Hunden, Katzen und Kaninchen studiert worden. Bei längerdauernder erschöpfender Reizung verlieren Ratten- und Katzenmuskeln bis 20% ihres K^+-Bestandes im Austausch gegen Na^+-Ionen; der Na^+-Gehalt kann daher bei Ermüdung bis um 100% zunehmen (Malorny und Netter[7]). Während der anschließenden oxydativen Erholungsprozesse kehren die veränderten extra- und intrazellulären Kationenkonzentrationen rasch wieder zur Ausgangslage zurück.

Die Überführung der Kationen erfolgt über außerordentlich hohe Konzentrationsunterschiede, so daß dieser Vorgang in erster Linie unter energetischen Gesichtspunkten betrachtet werden muß. Der Austausch in Richtung des Gefälles bei der Kontraktion kann Energie liefern, die Rückverschiebung gegen das Gefälle während der Erholung ist dagegen nur unter Aufwand einer beträchtlichen Konzentrationsarbeit möglich. Bei Gültigkeit des von Somogyi und Verzár[8] am Säugetier ermittelten Verhältnisses zwischen Muskelarbeit und K^+-Abgabe (4000 gcm Arbeit/1,5 mg K^+-Abgabe) genügt die osmotische Arbeit des Kationenaustausches (4000—6000 gcm) um die Zuckungsenergie vollständig zu decken (Fleckenstein[9]). Damit können die hohen Na^+-Werte im extrazellulären Raum und die entsprechend hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration als primärer Energiespeicher für die Kontraktion in Betracht gezogen werden. In 1 g Froschmuskel ist z. B. infolge der selektiven Akkumulation von Kalium fast dreimal soviel osmotische Energie (0,24 g-cal) gespeichert als aus der Spaltung der in 1 g

* Über die bioelektrische Seite der vorliegenden Ergebnisse wurde am 17. 6. 48 vor der Chemischen Gesellschaft der Technischen Hochschule Karlsruhe von Fleckenstein berichtet.

Froschmuskel enthaltenen Adenosintriphosphorsäure in Adenylsäure + Phosphorsäure an chemischer Energie (0,09 g-cal) geliefert werden könnte (Fleckenstein[10]).

Es ist wohlbegründete Lehre der Elektrophysiologie, daß die elektrischen Membranpotentiale an der ruhenden Muskelfaser durch die hohen Ungleichgewichte zwischen der extra- und intracellulären Kationenverteilung verursacht sind. Im Augenblick der Erregung tritt eine erhöhte Ionendurchlässigkeit dieser Grenzschichten ein und das hohe Membranpotential bricht zusammen („Depolarisation"). Die Entladungswelle, die sich als Aktionsstrom über die erregte Faser fortpflanzt, scheint nichts anderes als der elektrische Ausdruck des raschen Diffusionsaustausches von K^+ und Na^+ zu sein, der an der aufgelockerten Membran abläuft. Die hier angedeuteten Probleme sind an anderer Stelle[9, 10] eingehend dargelegt.

Um die engen Zusammenhänge zwischen dem mechanischen Akt der Muskelverkürzung und dieser Kationenbewegung (bzw. der elektrischen Entladung des Membranpotentials) weiter zu klären, mußten auch die Kontrakturzustände des Muskels einer näheren Analyse unterzogen werden. Bisher ist unbekannt, ob auch bei den Dauerverkürzungen — entsprechend den Verhältnissen bei der Kontraktion — in gesetzmäßiger Weise eine Abgabe von Kaliumionen erfolgt. Lediglich für die Kontraktur des Muskels nach Vergiftung mit Monojodessigsäure (Somogyi und Verzár[4]) und mit Guanidin (Rittmann und Form[11]) liegen Angaben über K^+-Austritte vor.

Es wurde daher im folgenden an isolierten Froschmuskeln systematisch geprüft.

1. Welche Kaliumaustritte bei der Dauerverkürzung des Muskels durch chemische Stoffe wie Coffein, Chloroform, Avertin, Milchsäure, Natronlauge, Natriumrhodanid, Acetylcholin, Nicotin sowie bei der Wärmekontraktur erfaßt werden können.

2. Ob Lokalanästhetika, die unter Umständen eine Kontraktur unterdrücken, dabei Einflüsse auf die Kaliumabgabe zeigen.

3. Ob ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen der Kaliumabgabe und der Verkürzung besteht und in welcher Hinsicht Kontraktur und Kontraktion gemeinsame Merkmale bzw. Verschiedenheiten erkennen lassen.

B. Experimenteller Teil.

1. Die Kaliumabgabe bei Kontraktur.

Methode. Zu den Versuchen wurden isolierte Mm. gastrocnemii von frisch gefangenen, hauptsächlich männlichen Esculenten verwendet. Die Muskeln wurden sorgfältig unter Vermeidung jeder Verletzung vom Femur abgelöst und 1 Stunde lang in reiner 0,6%iger NaCl-Lösung gebadet. Anschließend wird der Muskel an einem isotonischen Hebel (Vergrößerung 1 : 7, Belastung 4 g) befestigt und 20 Min. lang in ein Becherglas (a) mit 25 cm^3 reiner 0,6%iger NaCl-Lösung

eingetaucht. Längenänderungen des Muskels treten dabei nicht auf. Nach 20 Min. wird Becherglas (a) für weitere 20 Min. gegen ein zweites Becherglas (b) mit 25 cm³ 0,6% NaCl plus der darin gelösten kontrakturerzeugenden Substanz ausgewechselt und die eintretende Kontraktur am langsam laufenden Kymographion registriert. Das im Becherglas (a) und Becherglas (b) während jeweils 20 Min. übergetretene Kalium wird nach Eindampfen der Flüssigkeit (bei 80—90°) im Rückstand nach der Methode von Kramer und Tisdall[12] bestimmt. Die Fehlerbreite der Bestimmung war $\pm 0{,}005$ mg K^+. Unter „Spuren" werden im folgenden Kaliummengen verstanden, die etwa 0,01 mg K^+ nicht überschreiten.

Die ausgetretenen K^+-Mengen werden mit dem Ausmaß der Kontraktur in Beziehung gesetzt. Die Verkürzung ist jeweils als absoluter Wert in Millimetern angegeben und durch Division der auf dem Kymographion registrierten Kontrakturhöhe durch den Faktor 7 (Hebelvergrößerung) gewonnen.

a) Die Chloroformkontraktur. Die Starreverkürzung des Muskels durch hohe Konzentrationen eines Narkotikums ist am Beispiel der Chloroformkontraktur in zahlreichen Arbeiten studiert worden (vgl. O. Riesser[13]). Der Muskel zieht sich in Chloroformdampf oder in einer gesättigten Chloroformlösung rasch und kräftig zusammen und erreicht dabei auch die Spannung eines durch elektrische Reizung verursachten Tetanus. Es hat sich gezeigt, daß in der Chloroformstarre große Mengen Milchsäure gebildet werden (Fletcher und Hopkins[14], Parnas[15], Meyerhof[16]) und daß Adenosintriphosphorsäure (Lohmann[17], Barrenscheen und Mitarbeiter[18]) und Kreatinphosphorsäure rasch zerfallen. Präzisere Vorstellungen über den Mechanismus der Verkürzung bestehen nicht, doch wird die Spaltung der Adenosintriphosphorsäure als Ursache in Betracht gezogen.

In unseren Versuchen wurden die Mm. gastrocnemii von Eskulenten in einer gesättigten, wäßrigen Chloroformlösung mit 0,6% NaCl zur Kontraktur gebracht. Während sonst bei 20 Min. Aufenthalt in 0,6%iger reiner NaCl-Lösung kein Kalium oder nur eine Spur aus den Muskelfasern austritt, gibt der Muskel in Chloroformkontraktur in dieser Zeitspanne beträchtliche Mengen an K^+ ab (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Kaliumabgabe des Muskels in Chloroformkontraktur.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6% NaCl mg	K^+-Austritt in Chloroform mg	Verkürzung mm	Chloroformkonzentration
1	660	Spur	0,404	9,0	Gesättigte Lösung
2	650	Spur	0,382	9,0	„
3	670	0	0,173	7,1	„
4	670	0	0,253	5,6	„
5	640	Spur	Spur	0,0	Halbgesättigte Lösung
6	630	Spur	Spur	0,0	„

Eine nur halbgesättigte Chloroformlösung führte innerhalb von 20 Min. nicht mehr zur Verkürzung. Dementsprechend waren in diesen

Ansätzen auch nur Spuren von ausgetretenem K^+ erfaßbar, d. h. nicht mehr als in reiner 0,6%iger NaCl-Lösung.

b) Die Avertinkontraktur. Der Tribromäthylalkohol ist bisher noch nicht in physiologischen Untersuchungen zur Erzeugung von Dauerverkürzungen verwendet worden. Schon in Konzentrationen über 0,125% verursacht er Kontrakturen. Seine Wirksamkeit ist damit im Vergleich zu den von Schwenker[19] am Sartorius untersuchten Alkoholen (Methylalkohol bis Butylalkohol) sehr erheblich, entsprechend seinen stärkeren narkotischen Eigenschaften. Auch bei der Avertinkontraktur treten K^+-Ionen aus dem Muskel in den extrazellulären Raum über, wobei die Schwellen für die K^+-Abgabe und die mechanische Verkürzung offenbar wie beim Chloroform zusammenfallen. Unsere Versuche (Tabelle 2) lassen die Beziehung zwischen

Tabelle 2. *Kaliumabgabe des Muskels in Avertinkontraktur*.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6 % NaCl mg	K^+-Austritt in Avertinlösung mg	Verkürzung mm	Avertinkonzentration %
1	800	Spur	0,344	15	1
2	775	Spur	0,325	12,9	1
3	640	Spur	0,248	10,0	0,5
4	540	Spur	0,214	10,0	0,5
5	600	0	0,213	10,1	0,5
6	575	0	0,182	10,6	0,5
7	600	0	0,139	11,1	0,5
8	490	Spur	0,118	10,4	0,5
9	750	Spur	0,130	9,7	0,25
10	490	Spur	0,056	6,0	0,25
11	500	0	0,025	3,6	0,25
12	600	0	0,029	2,9	0,25
13	550	0	0	1,1	0,125
14	370	0,033	0,026	0	0,125
15	725	Spur	Spur	0	0,125
16	670	Spur	0,417	9,0	1
17	670	0	0,412	8,3	1
18	660	0	0,383	5,4	1
19	670	0	0,285	8,4	1
20	720	0	0,242	6,4	1

* Die Versuche Nr. 16—20 in Tabelle 2 wurden an Temporarien durchgeführt.

Kontraktur und K^+-Abgabe auch in quantitativer Hinsicht gut hervortreten: Die Kaliumaustritte nehmen deutlich mit der Kontrakturgröße zu. Allerdings besteht keine direkte Proportionalität, da offensichtlich bei höhergradigen Verkürzungen innerhalb 20 Min. relativ mehr K^+ erfaßbar wird als bei geringeren Verkürzungen. Es hängt dies wohl damit zusammen, daß z. B. in einer 1%igen Avertinlösung das Verkürzungsmaximum sehr schnell erreicht wird und dann der

Muskel über die ganze Zeit der Verkürzung weiterhin viel Kalium abgibt. Dagegen entwickelt sich die Kontraktur bei schwächeren Konzentrationen langsamer und erreicht unter Umständen erst am Ende des Versuchs bzw. überhaupt nicht innerhalb 20 Min. das Maximum. Die abgegebene K^+-Menge ist in solchen Fällen relativ geringer.

c) Die Milchsäurekontraktur. Beziehungen zwischen der Säurekontraktur und der Verkürzung des Muskels durch K^+-Salzlösung sind schon 1911 von Burridge zum ersten Mal erörtert worden. Auf Grund gewisser Ähnlichkeiten im Kontrakturverlauf nahm Burridge an, daß die Säuren (ebenso wie Nicotin) K^+-Ionen aus Adsorptionsbindungen an den Oberflächen und im Innern der Faser freisetzen und damit zu einer der Kaliumkontraktur entsprechenden Verkürzung führen könnten. K^+-Bestimmungen wurden nicht mitgeteilt. Unsere Ergebnisse (vgl. Tabelle 3) zeigen, daß auch bei der Milchsäurekontraktur Kalium in typischer Weise übertritt. Dagegen haben schwächere Konzentrationen, die nicht mehr zur Verkürzung führen, keine K^+-Abgabe zur Folge bzw. lassen nicht mehr K^+ austreten, als schon in reiner NaCl-Lösung erfaßbar ist.

Tabelle 3. *Kaliumabgabe des Muskels in Milchsäurekontraktur.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6% NaCl mg	K^+-Austritt in Milchsäurelösung mg	Verkürzung mm	Milchsäurekonzentration %
1	380	0,013	0,161	4,6	2
2	400	Spur	0,100	2,9	1
3	370	Spur	0,223	3,1	1
4	360	0	0,152	2,3	1
5	650	Spur	0,132	2,7	0,5
6	390	Spur	0.120	2,6	0,5
7	390	Spur	0,129	3,3	0,5
8	430	0	0,090	2,1	0,25
9	360	0	0,029	1,9	0,125
10	360	0,027	0,024	0,1	0,062
11	370	0	0	0	0,031

Der Zusammenhang zwischen K^+-Abgabe und dem mechanischen Akt der Verkürzung ist damit auch für die Milchsäurekontraktur gesichert.

d) Die Natronlaugekontraktur. Die Kontraktur des Muskels durch Basen führt bei höheren Konzentrationen zu sehr starken K^+-Austritten (Tabelle 4). In Versuch Nr. 1 wurde z. B. bei Einwirkung von 0,5% NaOH fast 1 mg K^+ innerhalb 20 Min. in der Außenlösung erfaßbar. Bei dem Muskelgewicht von 380 mg und einem intrazellulären K^+-Gehalt des Froschmuskels von etwa 4 mg/g bedeutet dies einen K^+-Verlust von $^2/_3$ des Bestandes. Geringere NaOH-Konzentrationen

Tabelle 4. *Kaliumabgabe des Muskels in Natronlaugekontraktur.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6 % NaCl mg	K^+-Austritt in NaOH-Lösung mg	Verkürzung mm	NaOH-Konzentration %
1	380	Spur	0,967	5,1	0,5
2	380	0,027	0.324	3,7	0,1
3	450	0	0,305	5,7	0,1
4	370	Spur	0,169	2,9	0,05
5	390	0	0,156	3,0	0,05
6	370	0	0,147	1,4	0,025
7	460	0	0,028	0,9	0,012
8	460	0	0,026	0,4	0,012
9	470	0,024	0,013	0,4	0,006
10	450	Spur	0,014	0	0,004

haben geringere K^+-Austritte zur Folge. Auch bei der Dauerverkürzung durch Natronlauge fällt die Schwelle für die Kontraktur mit der Schwelle für die K^+-Austritte zusammen.

Tabelle 5. *Kaliumabgabe des Muskels in Coffeinkontraktur.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6% NaCl mg	K^+-Austritt in Coffeinlösung mg	Verkürzung mm	Coffeinkonzentration %
1	550	0	0,585	11,0	1
2	560	0	0,490	11,0	0,5
3	470	Spur	0,385	10,6	0,5
4	520	0	0,479	12,3	0,5
5	510	0,027	0,476	8,7	0,5
6	730	0	0,370	10,4	0,5
7	560	0	0,138	6,8	0,5
8	600	0	0,159	7,4	0,5
9	540	0	0,159	9,0	0,5
10	680	0	0,084	6,1	0,5
11	600	Spur	0,253	7,9	0,5
12	650	Spur	0,191	8,0	0,5
13	630	Spur	0,128	8,3	0,5
14	860	0	0,297	10,7	0,25
15	460	0	0,323	11,6	0,25
16	410	0	0,341	10,1	0,25
17	840	0	Spur	2,4	0,125
18	450	Spur	Spur	1,9	0,125
19	630	0	Spur	0,1	0,062
20	650	0	Spur	0,1	0,062

e) Die Coffeinkontraktur. Außerordentlich zahlreiche Arbeiten haben sich mit der Coffeinkontraktur beschäftigt. Hierbei sind unter anderem die Bildung von Milchsäure, die Abnahme des Laktazidogengehaltes, der Zerfall der Adenosintriphosphorsäure und Kreatinphosphorsäure nachgewiesen. Unsere Ergebnisse (vgl. Tabelle 5) zeigen auch beim Coffein einen auffälligen Parallelismus zwischen

Kontraktur und K^+-Austritt. Eine nicht mehr kontrakturwirksame Coffeinkonzentration (0,062%) verursacht auch keine analytisch faßbaren K^+-Austritte.

f) Die Wärmekontraktur. Werden Froschmuskeln aus einer 0,6%-igen NaCl-Lösung von 18° plötzlich in eine Lösung von höherer Temperatur gebracht, so tritt von etwa 30° an eine Verkürzung ein. Auch hierbei geben die Muskelfasern K^+-Ionen ab (Tabelle 6). Die

Tabelle 6. *Kaliumabgabe des Muskels in Wärmekontraktur.*

Versuchs-Nr.	Muskelgewicht mg	K^+-Austritt in 0,6% NaCl mg	K^+-Austritt 18° in Wärme mg	Verkürzung mm	Temperatur Grad
1	490	0	0,513	8,4	42
2	490	0	0,292	7,7	42
3	540	0,023	0,058	2,9	30
4	550	0	0,039	1,9	35
5	470	Spur	Spur	2,1	35
6	480	0	Spur	0,3	30

Empfindlichkeit der Muskeln variiert ziemlich stark. Entscheidend ist jedoch, daß die K^+-Austritte nicht der Temperatur, sondern der jeweiligen Verkürzungsgröße entsprechen. Die Schwelle für Kontraktur und Kaliumabgabe ist offenbar auch bei dieser rein physikalisch ausgelösten Dauerverkürzung die gleiche.

g) Die Kontraktur durch Rhodannatrium. Auch in 2%iger Rhodannatriumlösung wird vom M. gastrocnemius Kalium freigesetzt, wie unsere Versuche ergeben haben. Die Verkürzung hatte jedoch anfänglich nicht den Charakter einer Kontraktur, sondern bestand aus Einzelzuckungen, die zuweilen tetanischen Charakter annahmen. Erst langsam entwickelte sich innerhalb von 20 Min. ein immer mehr zunehmender „Verkürzungsrückstand". Reine Verhältnisse liegen bei unseren Versuchen mit NaCNS also nicht vor.

h) Die Kontraktur durch Chinin. Bei der Chininkontraktur tritt ebenfalls Kalium in den extrazellulären Raum aus. Chinin stört jedoch die Bestimmung so beträchtlich, daß keine verbindlichen Analysenwerte mitgeteilt werden können.

i) Die „Erregungskontraktur" durch Acetylcholin und Nicotin. Acetylcholin (Konz. 1 : 10000) und Nicotin (Konz. 1 : 20000) bewirkten am M. gastrocnemius der von uns verwendeten Esculenten (frisch gefangene Sommerfrösche) nur relativ geringe Kontrakturen, die sich schon vor Versuchsende meist spontan zurückbildeten. Sichere K^+-Austritte in Begleitung dieser Kontrakturen waren bei einer Serie von 20 Fröschen nicht nachweisbar. Auch am M. rectus, der wesentlich stärker auf Acetylcholin- und Nicotin anspricht, ließ sich kein eindeutiges Ergebnis erzielen. Hier liegen die Schwierigkeiten in der

Präparation; denn infolge der Verletzung von Muskelelementen finden sich in der Regel schon in den Kontrollen ohne Acetylcholin gut bestimmbare K^+-Mengen. Ein gewisser Mehraustritt an K^+-Ionen während der Kontraktur scheint zwar angedeutet zu sein, liegt aber in unseren Versuchen nicht außerhalb der Fehlerbreite der Bestimmungsmethode.

Dagegen waren deutliche K^+-Abgaben am Froschdurchströmungspräparat nach Läwen-Trendelenburg erfaßbar (Durchströmung mit reiner 0,6%iger NaCl-Lösung): Hier treten nach Injektion von 0,2 cm^3 Acetylcholinlösung 1:1000 in den Zuflußschlauch zur Aorta fibrilläre Zuckungen der Beinmuskeln und eine Kontraktur der Mm. recti auf. Der K^+-Gehalt der ausfließenden Flüssigkeit ist anschließend für etwa 2 Min. deutlich erhöht*. Diese Befunde machen wahrscheinlich, daß auch bei der Acetylcholinkontraktur K^+-Ionen abgegeben werden — wenn auch in geringerer Menge als bei den sonstigen Kontrakturen. Es ist allerdings nicht zu entscheiden, wieviel Kalium den fibrillären Zuckungen entstammt. Auch Somogyi und Verzár[21] fanden bei Katzen nach intraarterieller Acetylcholininjektion eine Kaliumabgabe der Muskulatur, die unter diesen Umständen mit einem kurzen Tetanus reagiert.

2. Der Einfluß lokalanästhetischer Stoffe auf Kontraktur und K^+-Abgabe.

Methode. Der eine M. gastrocnemius (Rana esculenta) wird nach der Präparation für 1 Stunde in 0,6%ige NaCl-Lösung + Lokalanästhetikum eingelegt. Der andere M. gastrocnemius verbleibt in 0,6%iger reiner NaCl-Lösung. Anschließend werden die Muskeln jeweils in 0,6%iger NaCl-Lösung + Kontrakturstubstanz für 20 Min. eingetaucht und die Verkürzung registriert. Die K^+-Abgabe des einen, allein in NaCl-Lösung eingelegten Muskels und des anderen mit Lokalanästhetikum vorbehandelten Muskels wird verglichen und mit der Verkürzungsgröße in Beziehung gesetzt.

a) Novocain. Vorbehandlung mit Novocain hebt die Verkürzungsfähigkeit des Froschmuskels gegenüber zahlreichen kontrakturerzeugenden Substanzen auf. Dies gilt für Acetylcholin (Riesser und Neuschloss[22]), Nicotin (Frank und Katz[23]), Veratrin (Schüller und Athmer[24]), Guanidin (Frank und Stern[25]), Natriumrhodanid, (de Boer[26]), Coffein (Schüller[27]). Unsere Versuche, die sich zunächst hauptsächlich auf die Kontrakturen durch Coffein, Avertin, Milchsäure, Natronlauge, Rhodannatrium und Wärme erstreckten, führten nun zu dem eindeutigen Ergebnis, daß

1. Novocain die K^+-Austritte aus der Muskulatur aufhebt, wenn es eine Kontraktur unterdrückt,

* Über die Versuche mit Acetylcholin sowie Nicotin soll noch gesondert berichtet werden.

2. Novocain die K^+-Austritte nur teilweise oder überhaupt nicht herabsetzt, wenn es eine Kontraktur nur teilweise oder überhaupt nicht verhindert.

Die Kontraktur des Muskels durch $^1/_2$%ige Avertinlösung ist nach einstündiger Vorbehandlung mit 1% Novocain samt der K^+-Abgabe weitgehend unterdrückt (Tabelle 7).

Tabelle 7. *Einfluß von Novocain (1%) auf Kontraktur und K^+-Abgabe. (Avertin- und Coffeinkontraktur.)*

Kontraktursubstanz	0,6% NaCl-Lösung		0,6% NaCl-Lösung mit 1% Novocain	
	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg
$^1/_2$% Avertin	10,0	0,248	2,3	Spur
$^1/_2$% Avertin	10,4	0,118	1,1	Spur
$^1/_2$% Avertin	11,1	0,139	0,6	0
$^1/_2$% Coffein	8,7	0,621	1,4	0
$^1/_2$% Coffein	8,7	0,476	1,7	Spur
$^1/_2$% Coffein	10,1	0,341	1,1	Spur
$^1/_2$% Coffein	12,3	0,479	7,0	0,148

Ebenso wird durch diese Vorbehandlung die K^+-Abgabe und die Kontraktur des M. gastrocnemius in $^1/_2$%iger Coffeinlösung blockiert. Wenn die Kontraktur nicht aufgehoben, sondern nur erniedrigt wird, treten auch noch analytisch gut faßbare Kaliummengen in den extrazellulären Raum über (Versuch Nr. 7). Die nicht mit Novocain behandelten Muskeln sind am Ende des Versuchs starr und irreversibel geschädigt, dagegen erlangen die Novocainmuskeln nach einiger Zeit in NaCl-Lösung wieder ihre volle elektrische Erregbarkeit. Die Kontraktur und K^+-Abgabe durch Milchsäure ist bei einstündiger Novocainvorbehandlung nur teilweise, die Wärmekontraktur (bei 42°) überhaupt nicht deutlich zu beeinflussen. Bei der Natronlaugekontraktur wird nur die „Anfangsverkürzung" (Riesser[13]), die Ausdruck einer echten Erregung sein dürfte, durch 1% Novocain unterdrückt, während die nachhinkende Kontraktur keine klare Beeinflussung zeigt. Eindeutige Unterschiede in der K^+-Abgabe waren dementsprechend nicht zu erfassen. Auch bei der Kontraktur durch Rhodan-Natrium unterdrückt Novocain viel eher die Einzelzuckungen als die Kontraktur selbst.

b) Tutocain. Tutocain hemmt in $^1/_2$%iger Lösung die Coffeinkontraktur und die gleichzeitigen Kaliumaustritte beim M. gastrocnemius ähnlich stark wie 1% Novocain, dagegen wird die Avertinkontraktur anscheinend weniger beeinflußt (vgl. Tabelle 8).

Auch hierbei geht Kontraktur und K^+-Abgabe parallel. Die durch Tutocain geschützten Muskeln werden wieder elektrisch erregbar.

Tabelle 8. *Einfluß von Tutocain (1/2%) auf Kontraktur und K^+-Abgabe. (Coffein- und Avertinkontraktur.)*

Kontrakturstubstanz	0,6% NaCl-Lösung		0,6% NaCl-Lösung mit 1/2% Tutocain	
	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg
1/2% Coffein	10,4	0,370	1,4	Spur
1/2% Coffein	6,8	0,138	0,4	0
1/2% Coffein	7,4	0,159	0,9	0
1/2% Coffein	8,1	0,244	0,1	0
1% Avertin	2,4	0,043	0	0,016
1% Avertin	8,3	0,412	5,0	0,283

Zur Aufhebung der Acetylcholin- und Nicotinkontraktur ist Tutocain ebenso wie Novocain noch in hoher Verdünnung geeignet.

c) Pantocain. Pantocain (1/4%ige Lösung in 0,6% NaCl) ist bei der Avertinkontraktur ohne deutliche Wirkung, die Coffeinkontraktur wird hingegen gleich der K^+-Abgabe nach einstündiger Vorbehandlung gut unterdrückt (Tabelle 9).

Tabelle 9. *Einfluß von Pantocain (1/4%) auf Kontraktur und K^+-Abgabe. (Avertin- und Coffeinkontraktur.)*

Kontrakturstubstanz	0,6% NaCl-Lösung		0,6% NaCl-Lösung mit 1/4% Pantocain	
	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg	Verkürzung mm	K^+-Abgabe mg
1/2% Coffein	6,1	0,084	0	0
1/2% Coffein	7,9	0,253	0	0
1/2% Coffein	8,0	0,191	0,1	0
1% Avertin	8,4	0,285	7,3	0,297

Die Nicotin- und Acetylcholinkontraktur tritt schon nach kurzer Einwirkung von Pantocain am M. rectus von Esculenten nicht mehr auf.

d) Sonstige Lokalanästhetika bzw. Antihistaminstoffe. Vorbehandlung des M. gastrocnemius mit Cocain (1/10%ige Lösung über 1 Stunde) hat auf die Kontraktur durch 1% Avertin und 1/2% Coffein keinen wesentlichen Einfluß, es verhindert dementsprechend den K^+-Austritt nicht. Percain führt in Konzentration über 0,3% am M. gastrocnemius selbst zu Kontraktur und K^+-Abgabe. Die für den Muskel unschädlichen Konzentrationen genügen nicht, um die Kontraktur bei den angewandten Avertin- und Coffeinkonzentrationen aufzuheben oder bedeutend abzuschwächen. Dagegen hemmen Cocain, Percain, sowie Antihistaminstoffe wie Antistin, Dimethylantergan usw. — gleich allen anderen von uns geprüften lokalanästhetisch wirksamen Stoffen — die Acetylcholin- und Nicotinkontraktur noch in hohen Verdünnungen.

C. Besprechung.

a) Kaliumabgabe und Kontraktur. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß auch bei den Muskelkontrakturen der mechanische Prozeß der Verkürzung mit einer K^+-Abgabe an den extrazellulären Raum gekoppelt ist: Die K^+-Austritte beginnen, wenn die Verkürzung einsetzt und nehmen jeweils mit der Verkürzungsgröße zu (Abb. 1). Bei elektrischer Reizung bis zur Ermüdung verliert der isolierte M. sartorius von ungarischen Esculenten innerhalb von 10 Min. etwa 0,2 mg K^+/1 g Muskel (Somogyi und Verzár[4]). Einen ähnlichen Wert (0,162 mg K^+/1 g Muskel) fand Reginster[2] bei ermüdender Arbeit des Froschgastrocnemius über die gleiche Zeitdauer. Unsere Werte bei stärkeren Muskelkontrakturen durch Chloroform, Avertin, Milchsäure, Natronlauge, Coffein, Rhodannatrium und Wärme liegen etwa in der gleichen Größenordnung, wenn man die längere Versuchsdauer von 20 Min. berücksichtigt. Dagegen scheint die K^+-Abgabe des M. gastrocnemius und M. rectus bei der Kontraktur durch Acetylcholin und Nicotin wesentlich geringer zu sein. Man gewinnt den Eindruck, daß auch hinsichtlich der K^+-Austritte ähnliche quantitative Unterschiede zwischen der Acetylcholinkontraktur und einer tetanischen Verkürzung bestehen wie hinsichtlich der Milchsäurebildung und des Sauerstoffverbrauchs (vgl. Janssen[28], Zondek und Matakas[29]). Sichere K^+-Austritte waren erst im Durchströmungspräparat nach Läwen-Trendelenburg erfaßbar. Allerdings führt Acetylcholin bei intraarterieller Injektion am Froschdurchströmungspräparat (Rana esculenta) nicht nur zu glatten Kontrakturen, sondern auch zu fibrillären Zuckungen und Kontraktionen, so daß keine ganz reinen Verhältnisse vorliegen.

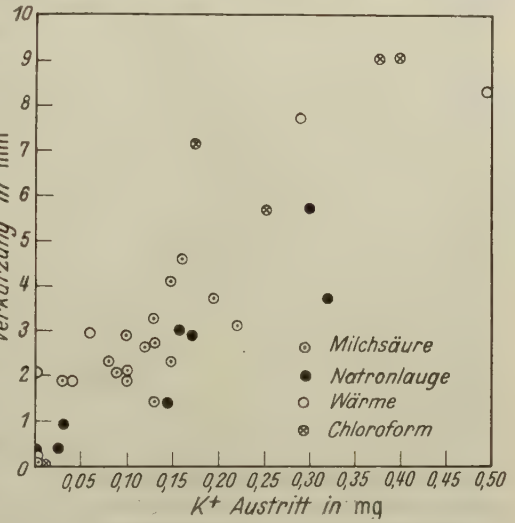


Abb. 1. Kaliumaustritte bei der Kontraktur des M. gastrocnemius durch Milchsäure, Natronlauge, Chloroform und Wärme.

b) Kaliumabgabe und Membranpotential. Die K^+-Abgabe des Muskels bei der Kontraktur ist offenbar ebenso wie bei natürlicher Erregung durch eine Permeabilitätserhöhung der Fasergrenzflächen (vgl. Höber[30], Ebbecke[31] u. a.) verursacht. Kontrakturgifte sind

demnach Substanzen, die die Membranen der Muskelfasern entweder durch einfache, reversible Permeabilitätserhöhung oder durch irreversible Destruktion im Sinne einer erhöhten Ionendurchlässigkeit verändern. Nach der Lehre der Elektrophysiologie muß damit gleichzeitig ein Verlust des im Ruhezustand vorliegenden elektrischen Membranpotentials, eine „Depolarisation" verbunden sein (vgl. Schaefer[32]). Schon von Henze[33] wurde für Kontrakturgifte wie Coffein, Cholin, Veratrin, Nicotin, Chinin eine derartige Entladung des Ruhepotentials mitgeteilt. Ebenso zeigt nach Riesser und Steinhausen[34] die Acetylcholinkontraktur eine Negativierung der Faseroberflächen. Der Parallelismus von Depolarisation und Verkürzung wird neuerdings besonders von Kuffler[35] auf Grund seiner Ergebnisse bei den Kontrakturzuständen durch Kaliumsalze, Acetylcholin, Veratrin und Coffein betont. Auch kathodenstrahl-oszillographische Messungen von Fleckenstein, Muschaweck und Staab[36] haben bei der Avertin-, Chinin-, Coffein- und Wärmekontraktur gezeigt, daß die Verkürzung gleichzeitig mit der beginnenden Entladung des Membranpotentials einsetzt und sich parallel dem fortschreitenden Zusammenbruch des Potentials weiter entwickelt (vgl. Abb. 2). Einem bestimmten Potential scheint jeweils ein bestimmter Verkürzungsgrad zu entsprechen, ohne Rücksicht auf die jeweilige Ursache der Kontraktur. Auch die idiomuskulären Wülste (P. Hoffmann[37]), der tetanische Verkürzungsrückstand (Beritoff und Woronzow[38]) und die Kontraktur durch Rubidiumsalze (Zoethout[39]) sind durch Entladung des Membranpotentials gekennzeichnet.

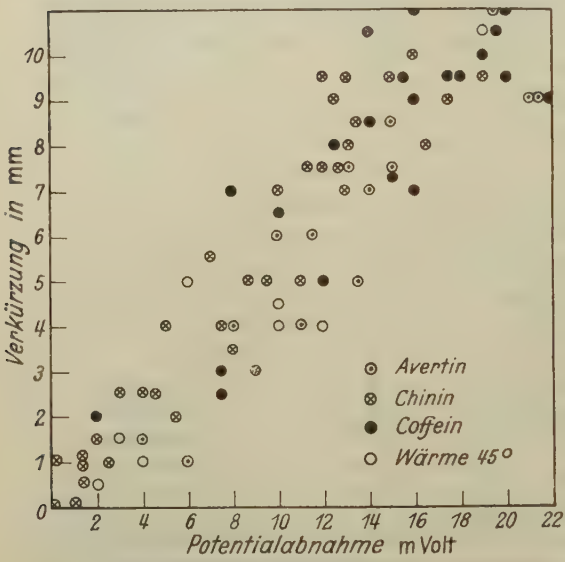


Abb. 2. Potentialabnahme und Verkürzung des M. sartorius durch Avertin, Chinin, Coffein und Wärme (45°). Messung des Verletzungspotentials an den Muskeln gleichgroßer männlicher Esculenten (etwa 60 g) bei Einwirkung verschiedener Konzentrationen der Kontrakturstoffe. Es wurden hierbei Muskeln verwendet, die zu Beginn ein Verletzungspotential von 38—40 mV aufwiesen. Kathodenstrahloszillograph mit Gleichstromverstärker.

c) Zum Verkürzungsmechanismus bei den Erregungs- und Schädigungskontrakturen. Die entscheidende Frage ist, ob diese — unter

FEB 7 1950

K^+-Austritten einhergehende Entladung der Fasergrenzflächen Ursache oder Folge des mechanischen Verkürzungsaktes darstellt. Für die primäre Bedeutung dieser ionen-elektrischen Prozesse spricht, daß schon die alleinige Beeinflussung der Membranladung durch Gleichstrom zu Längenänderungen des Muskels führen kann: So zeigt ein in der Kathodenregion „depolarisierter" Muskel für die Dauer der Durchströmung den bekannten „Kathodenwulst". Umgekehrt kann eine bestehende Acetylcholinkontraktur nach Kuffler[10] aufgehoben werden, wenn die im Kontrakturzustand entladene Membran durch die Anode wieder gedichtet und „repolarisiert" wird. Die Acetylcholinkontraktur tritt erneut auf, wenn der Strom abgeschaltet wird. Die Aufhebung der Veratrinkontraktur durch die Anode ist bereits von Biedermann[41] beobachtet worden. Diese Befunde stützen die Vorstellung, daß die längerdauernde Entladung der Membran unter K^+-Austritten (und Na^+-Eintritten) für die Erregungskontrakturen durch Acetylcholin, Veratrin (und auch Nicotin) ebenso entscheidend ist, wie die rasche Entladungswelle des Aktionsstroms für die schnelle Kontraktion. Die Kontrakturwirkung von Acetylcholin, Nicotin und Veratrin in den üblichen Konzentrationen ist auf elektrisch erregbare Muskeln beschränkt; schon Entzug des extrazellulären Natriums in isotonischer Zuckerlösung hebt gleichzeitig mit dem Verlust der elektrischen Erregbarkeit auch die Fähigkeit zur Acetylcholin-, Nicotin- und Veratrinverkürzung auf (Fleckenstein und Hertel[42]).

Bei den „Schädigungskontrakturen" durch Coffein, Chloroform, Chinin, Säuren und Wärme liegen die Verhältnisse etwas schwieriger. Hier muß wahrscheinlich eine „Anfangsverkürzung" — als Äquivalent einer mehr oder weniger echten Erregung — von der nachfolgenden Starreverkürzung unterschieden werden, die kaum mehr etwas mit dem physiologischen Verkürzungsakt gemeinsam hat (vgl. Riesser[13]). Durch die primäre Membrandestruktion und elektrische Entladung wird anscheinend die Geschwindigkeit des Verkürzungseintrittes bestimmt; hieran schließt sich aber mehr oder weniger schnell eine zweite Phase an, in der sich durch Kolloidfällung in der Tiefe eine irreversible Starreverkürzung ausbildet. Hierbei können sich auch noch tote Muskeln zusammenziehen, die ihr Potential schon verloren haben oder die in isotonischer KCl-Lösung stromlos geworden sind (Fleckenstein, Muschaweck und Staab[36]). Die „Schädigungskontrakturen" sind demnach als Modelle des physiologischen Verkürzungsvorganges nicht sehr geeignet, sie lassen aber doch erkennen, daß die K^+-Abgabe, die elektrische Entladung *und* die Kontraktur des Muskels in enger Abhängigkeit voneinander eintreten.

d) Zum Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika auf Kontraktur und Erregungsleitung. Die Verhinderung der K^+-Abgabe und der Kontraktur durch lokalanästhetische Stoffe dürfte auf einem den

Kontrakturgiften entgegengerichteten Dichtungs- und Stabilisierungseffekt an den Membranen beruhen (Abb. 3). Novocainbehandelte Froschmuskeln, die sich bei Einwirkung von Coffein nicht mehr verkürzen und kein Kalium abgeben, behalten dementsprechend auch ihr Ruhepotential bei (vgl. Schüller[27]). Die gleiche Beobachtung konnte z. B. auch bei der Aufhebung der Acetylcholin-, Nicotin- und Avertinkontraktur gemacht werden (Fleckenstein, Muschaweck und

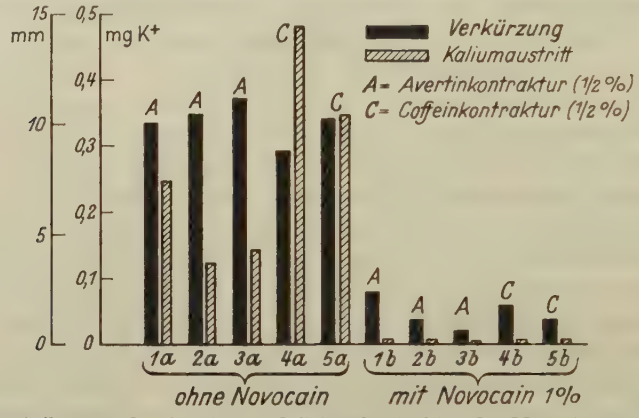


Abb. 3. Beeinflussung der Avertin- und Coffeinkontraktur des M. gastrocnemius sowie der gleichzeitigen Kaliumabgabe durch Novocainvorbehandlung. Muskeln *1a—5a* rechte M. gastrocnemii, Muskeln *1b—5b* linke M. gastrocnemii der gleichen Esculenten.

Staab[36]). Die Lokalanästhetika unterdrücken anscheinend die Kontrakturwirkung derjenigen Stoffe am besten, die die Membran — ähnlich wie bei natürlicher Erregung — in reversibler Weise und ohne grobe Zerstörung depolarisieren. Eine besonders hohe Wirksamkeit besteht daher gegenüber den „Erregungskontrakturen" durch Acetylcholin und Nicotin. Eine Reihe neuer Lokalanästhetika hemmt z. B. nach Ergebnissen von Eichholtz und Calame[43] am Froschrectus die Acetylcholinkontraktur zum Teil noch in millionenfacher Verdünnung um mehr als 50%. Trotz Verschiedenheiten in der chemischen Konstitution dürfte diese hemmende Wirkung gegenüber der Acetylcholin- und Nicotinkontraktur eine gemeinsame Eigenschaft aller Lokalanästhetika darstellen. Dagegen sind zur Unterdrückung anderer Kontrakturarten (z. B. Avertin und Coffein) stärkere Konzentrationen erforderlich bzw. auch nicht alle Lokalanästhetika hinreichend wirksam.

Da Acetylcholin nach der chemischen Theorie der Nervenleitung für die Erregungsfortpflanzung entscheidend sein soll*, hat Thimann[45]

* Neue Untersuchungen mit markiertem, radioaktivem Stickstoff (Rothenberg und Mitarbeiter[44]) haben wahrscheinlich gemacht, daß Acetylcholin während der Erregungsleitung nicht freigesetzt wird, sondern allein an den Synapsen wirkt.

zur Erklärung der Leitungsunterbrechung durch Lokalanästhetika einen spezifischen Antagonismus gegenüber Acetylcholin angenommen: Cocain und andere lokalanästhetisch wirksame Stoffe sollen auf Grund struktureller Ähnlichkeiten Acetylcholin von seinen Reaktionsorten verdrängen und so die Erregung blockieren. Der membranstabilisierende, dichtende, die K^+-Austritte verhindernde Effekt der Lokalanästhetika bietet jedoch für die Aufhebung der Erregungsleitung schon eine rein elektro-physiologische Erklärung: Die für den Erregungsablauf entscheidende Auflockerung der Grenzflächen, die Membrandepolarisation wird verhindert. Die Lokalanästhetika wirken damit ganz ähnlich wie eine Anode, die ebenfalls durch Stabilisierung der erregbaren Grenzflächen die Nervenleitung blockieren kann und, wie bereits erwähnt, nach BIEDERMANN[41] und KUFFLER[40] auch die Acetylcholin- und Veratrinkontraktur auslöscht.

Zusammenfassung.

1. Isolierte Froschmuskeln geben bei Kontraktur durch Chloroform, Avertin, Milchsäure, Natronlauge, Coffein, Chinin, Rhodannatrium und Wärme Kaliumionen an den extrazellulären Raum ab. Für die Dauerverkürzung durch Monojodessigsäure und Guanidin liegen entsprechende Literaturangaben vor.

2. Die K^+-Austritte sind an den Verkürzungsakt gebunden. Die Schwelle für die Kontraktur ist mit der Schwelle für die K^+-Abgabe identisch; mit wachsender Verkürzung werden steigende K^+-Mengen extrazellulär erfaßbar.

3. Kontrakturgifte führen an den Fasergrenzflächen zu erhöhter Ionendurchlässigkeit und dadurch unter K^+-Austritten zum Zusammenbruch des Membranpotentials. Die Verkürzung geht der elektrischen Entladung parallel.

4. Kontrakturverhütende Lokalanästhetika haben an den Membranen einen den Kontrakturgiften entgegengerichteten Dichtungs- und Stabilisierungseffekt. Novocain unterdrückt gleichzeitig mit der Coffein- und Avertinkontraktur auch die K^+-Abgabe und elektrische Entladung der Muskelfasern. Tutocain und Pantocain hemmen die K^+-Abgabe und Kontraktur durch Avertin weniger.

5. Mit der Stabilisierung der Grenzschichten verhindern die Lokalanästhetika den Grundprozeß jeder Erregung, die „Membrandepolarisation". Die Aufhebung der Nervenleitung gleicht hierin dem Anodenblock der Elektrophysiologie. Gegenüber den „Erregungskontrakturen" durch Acetylcholin und Nicotin sind Lokalanästhetika noch in besonders hoher Verdünnung wirksam.

Literatur.

[1] Fenn, W. O., and D. M. Cobb: Amer. J. Physiol. **112**, 41 (1935); **115**, 345 (1936). — Fenn, W. O., D. M. Cobb, J. F. Manery and W. R. Bloor: Amer. J. Physiol. **121**, 595 (1938). — Fenn, W. O.: J. biol. Chem. (Am.) **128**, 297 (1939). Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **37**, 71 (1937). — Amer. J. Physiol. **120**, 675 (1937); **127**, 356 (1939). — Physiol. Rev. (Am.) **16**, 450 (1936); **20**, 377 (1940). — Ann. Rev. Physiol. **1941**, 209. — Fenn, W. O., R. H. Koenemann, B. V. Fatava and E. T. Sheridan: Amer. J. Physiol. **131**, 494 (1940). — [2] Reginster, A.: Arch. internat. Physiol. et Pharm. **45**, 69 (1937); **47**, 24, 71 (1938). — [3] Wood, E. H., D. A. Collins and G. K. Moe: Amer. J. Physiol. **126**, 657 (1939); **128**, 635 (1940). — [4] Somogyi, J. C. u. F. Verzár: Helvet. med. Acta **7**, Suppl. VI, 81 (1940/41). — [5] Tipton, S. R.: Amer. J. Physiol. **124**, 322 (1938). — [6] Steinbach, H. B.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 849 (1947). — [7] Malorny, G., u. H. Netter: Pflügers Arch. **234**, 680 (1934). — [8] Somogyi, J. C., et F. Verzár: Arch. internat. Pharmacodynam. **65**, 17 (1941). — [9] Fleckenstein, A.: Pflügers Arch. **246**, 411 (1942). — [10] Fleckenstein, A.: Pflügers Arch. **250**, 643 (1948). — [11] Rittmann, R., u. O. Form: Z. exper. Med. **48**, 191 (1926). — [12] Kramer, B., and F. F. Tisdall: J. biol. Chem. (Am.) **46**, 339 (1921). — [13] Riesser, O.: Kontraktur und Starre. In Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. VIII, Teil 1, S. 218. [14] Fletcher, W. M., and F. G. Hopkins: J. Physiol. (Brit.) **35**, 266 (1907). — [15] Parnas, J., u. R. Wagner: Biochem. Z. **61**, 387 (1914). — [16] Meyerhof, O.: Pflügers Arch. **182**, 232 (1920). — [17] Lohmann, K.: Biochem. Z. **203**, 172 (1928). — [18] Barrenscheen, H. K., L. Frey u. O. Renth: Biochem. Z. **240**, 394 (1931). — [19] Schwenker, G.: Pflügers Arch. **157**, 371 (1914). — [20] Burridge, W.: J. Physiol. (Brit.) **42**, 359 (1911). — [21] Somogyi, J. C., u. F. Verzár: Arch. internat. Pharmacodynam. **65**, 221 (1941). — [22] Riesser, O., u. S. M. Neuschloss: Arch. exper. Path. (D.) **91**, 342 (1921). — [23] Frank, E., u. R. A. Katz: Arch. exper. Path. (D.) **90**, 149 (1921). — [24] Schüller, J., u. F. Athmer: Arch. exper. Path. (D.) **91**, 125 (1921). — [25] Frank, E., u. R. Stern: Arch. exper. Path. (D.) **90**, 168 (1921). — [26] de Boer, S.: Dtsch. med. Wschr. **1922**, 831. — [27] Schüller, J.: Arch. exper. Path. (D.) **119**, 31 (1927). — [28] Janssen, S.: Arch. exper. Path. (D.) **119**, 31 (1927). [29] Zondek, S. G., u. F. Matakas: Biochem. Z. **214**, 320 (1929). — [30] Höber, R.: Physikalische Chemie der Zellen und der Gewebe. Leipzig 1926. — [31] Ebbecke, U.: Pflügers Arch. **190**, 250 (1921); **195**, 300, 324, 555 (1922); **197**, 482 (1923). — [32] Schaefer, H.: Elektrophysiologie, Bd. I. Wien: Franz Deuticke 1940. — [33] Henze, M.: Pflügers Arch. **92**, 451 (1902). — [34] Riesser, O., u. W. Steinhausen: Pflügers Arch. **197**, 288 (1922). — Steinhausen, W.: Biochem. Z. **156**, 201 (1925). [35] Kuffler, S. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 767 (1947). — J. Neurophysiol. **5**, 199, 309 (1942); **6**, 99 (1943). — [36] Fleckenstein, A., R. Muschaweck u. K. Staab: Unveröffentlicht. — [37] Hoffmann, P.: Z. Biol. **61**, 311 (1913). — [38] Beritoff, J., u. D. Woronzow: Z. Biol. **84**, 417 (1926). — [39] Zoethout: Amer. J. Physiol. **10**, 211 (1904). — [40] Kuffler, S. W.: J. Neurophysiol. **9**, 367 (1946). — [41] Biedermann, W.: Elektrophysiologie. Jena 1895. — [42] Flecknstein, A., u. A. Hertel: Pflügers Arch. **1948**. — [43] Eichholtz, F., u. B. Calame: Unveröffentlicht. — [44] Rothenberg, M. A. u. Mitarb.: J. Neurophysiol. **11**, 110 (1948). — [45] Thimann, K. V.: Arch. Biochem. **2**, 87 (1943).

Dr. Annemarie Hardt, Heidelberg,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 55—65 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.

Untersuchungen über die Wirkung von Borsäure und von Mischungen der Borsäure mit aliphatischen Polyoxyverbindungen.

Von

Hans Friedrich Zipf und Georg Stephan.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 22. Oktober 1948.)

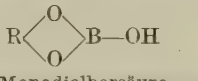
Die Erkenntnisse über die Borsäurewirkung erfuhren in den letzten Jahrzehnten weniger von pharmakologischer als von der pflanzenbiologischen Seite eine Bereicherung. Im ersten Weltkrieg machte sich der Mangel an borhaltigem Chilesalpeter bekanntlich recht unliebsam bemerkbar. Man war damals auf die Verwendung von synthetischem Stickstoffdünger allein angewiesen. Dadurch kam es zu Wachstumsstörungen, die man jedoch durch Zusatz von geeigneten Borsäuremengen verhindern konnte. Andererseits wirkte ein zu großer Boratgehalt des Bodens schädigend auf das Pflanzenwachstum (Kuhn[1]). Borsäure bildet einen natürlichen Bestandteil zahlreicher niederer und höherer Pflanzen (Takagi[2], Gabriel und Silberstein[3], Partridge[4], Scott-Dodd[5], Dunn und Bloxam[6]). Man hat in den letzten Jahren die biologische Bedeutung der Borsäure näher untersucht und herausgefunden, daß der Bildung von *Borsäurekomplexen in der Entwicklung vieler Pflanzen* eine wichtige Rolle zukommt (Kuhn[1,7], Kuhn, Löw und Möwus[8]). Besonders solche Pflanzen, die Flavonole enthalten, haben einen großen Borbedarf (Tauböck[9]), wahrscheinlich, weil die Borsäure durch Komplexblidung an den Flavonolen gebunden wird.

Da die Borsäure (bzw. Borat) grundsätzlich mit sehr vielen Polyoxyverbindungen Komplexe bilden kann, erhebt sich die Frage, ob sie einerseits durch den Reaktionspartner in ihrer Wirkung beeinflußt wird, andererseits die Wirkung des Reaktionspartners verändern kann. Unter diesem Gesichtspunkte wurden die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt. Wir wählten als Reaktionspartner solche Polyoxyverbindungen aus, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung von chemischer Seite schon recht gut gekennzeichnet sind, nämlich verschiedene Zuckeralkohole (Glyzerin, Mannit, Sorbit, Galaktose, Glukose). Die Prüfung erfolgte an Organismen verschiedener Entwicklungsstufen, und zwar an Kaulquappen, Bakterien (Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Staphylococcus aureus, Streptococcus

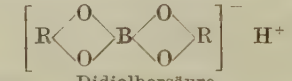
haemolyticus), Ciliaten (Colpoda steini), Hefe und pathogenen Pilzen (Trichophyton cerebriforme, Epidermophyton Kaufmann-Wolf).

Chemie der Borsäurekomplexverbindungen mit Polyoxyverbindungen.

Die Azidität der Borsäure ist so gering, daß sie titrimetrisch gar nicht erfaßt werden kann. Nach Thomson[10] und Jörgenson[11] kann man aber durch Zufügen von Glyzerin, Mannit und anderer mehrfach hydroxylierter Substanzen zu einer wäßrigen Borsäurelösung deren Azidität beträchtlich steigern, so daß sich Borsäure gegen Phenolphthalein titrieren läßt. Nach Boeseken[12] sind solche Polyoxyverbindungen in der Lage, die Leitfähigkeit einer Borsäurelösung zu erhöhen, die zwei benachbarte Hydroxylgruppen cis-ständig tragen, d. h. auf der gleichen Seite einer durch die Kohlenstoffkette gelegene Ebene (sog. Diole). Dazu gehören z. B. Verbindungen wie Mannit, Sorbit, Galaktose, Glukose, Fruktose, aber auch Brenzkatechin, Salizylsäure u. a. Hermans[13] unterscheidet zwei Typen von Borsäurepolyoxyverbindungen, die Monodiolborsäure und die Didiolborsäure.



Monodiolborsäure



Didiolborsäure

Schäfer[14] stellte fest, daß für die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration im wesentlichen nur die Didiolborsäure verantwortlich ist. An stärksten aziditätssteigernd wirken (nach Schäfer) Mannit und Fruktose, die in ihrer Wirkungsstärke fast übereinstimmen, geringer Glukose und Mesoerythrit und am wenigsten Glyzerin. Auch Rohrzucker verbindet sich nach Voicu und Axente[15] mit Borsäure. Nach Schäfer ist die Neigung der freien Borsäure, mit Mannit und anderen Polyoxyverbindungen Komplexe zu bilden, gering gegenüber der großen Reaktionsfähigkeit der Borationen. Auch durch noch so große Überschüsse läßt sich die freie Borsäure in wäßriger Lösung nicht vollkommen in Komplexe überführen. Fügt man einem solchen System jedoch NaOH hinzu, dann entstehen in reichlicher Menge Borationen, die viel rascher mit dem Diol unter Komplexbildungen reagieren. Erwartungsgemäß muß also in jedem alkalischen Medium die Neigung der Borsäure zur Komplexbildung stärker sein als im sauren Gebiete.

Die wesentlichsten Vorgänge in der wäßrigen Lösung lassen sich durch die Gleichgewichtsbeziehungen wiedergeben:

1. Borat + Diol = Monodiolborat + Wasser.
2. Monodiolborat + Diol = Didiolborat + Wasser.

Daraus ergeben sich zwei Dissoziationskonstanten:

$$K_1 = \frac{\text{Monodiolborat}}{\text{Borat} \times \text{Diol}}; \text{ für Mannit } K_1 = 3{,}4 \cdot 10^3.$$

$$K_2 = \frac{\text{Didiolborat}}{\text{Monodiolborat} \times \text{Diol}}; \text{ für Mannit } K_2 = 44.$$

Das erste Gleichgewicht stellt sich unmeßbar schnell ein, das zweite langsamer. Die Neigung zu Didiolkomplexen ist also wesentlich geringer. Auf Grund sterischer Betrachtungen sind in wäßrigen Lösungen z. B. neben Mono- und Dimannitborationen auch Mannit-diborat-Ionen zu erwarten, anscheinend sogar in höherem Maße, als man bisher angenommen hat. Nach Tsuzuki[16] nimmt die Bereitschaft, z. B. mit Weinsäure Komplexe zu bilden, in der Reihenfolge $H_3BO_3 < Na_2B_4O_7 < KBO_2$ sprunghaft zu.

Versuchsbedingungen.

Die *Borsäurekomplexlösungen* wurden durch Verdünnungen aus einer 4%igen Borsäurelösung hergestellt, die bei Zimmertemperatur durch Mischen mit den jeweils gewählten Mengen von Polyalkoholen zubereitet worden war. Entsprechend den von chemischen Untersuchern erhobenen optimalen Bedingungen wählten wir für die Reaktionen zwischen Borsäure und Mannit bzw. Sorbit das molare Verhältnis 1 : 1, zwischen Borsäure und Galaktose bzw. Glukose oder Glyzerin das molare Verhältnis 1 : 2. Die p_H-Messungen erfolgten, da die Chinhydronelektrode hierzu bekanntlich nicht geeignet ist, mit der Glaselektrode und mit „Lyphan"-Papier. Unterhalb p_H 3,0 war die Glaselektrode nicht mehr zu verwenden.

Zur Prüfung an *Kaulquappen* wurde deren Absterbezeit in den Lösungen bestimmt. Die Untersuchung an *Ziliaten* erfolgte in 3 cm³ einer gut gewachsenen Kultur von Colpoda steini in Leitungswasser, die 3 Tropfen einer Abschwemmung von Colischrägröhrchen als Nahrung enthielten. Zur Feststellung der Vermehrung oder des Absterbens wurden die Kulturen mit einer Binokularlupe beobachtet.

Bei der Prüfung an *Bakterien** (Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus) wurde jeweils 1 cm³ Fleischwasserbouillon (p_H 7,4) in kleinen Röhrchen mit 1 cm³ einer Lösung von Borsäure bzw. -komplexen im Bouillon gemischt. Die Beimpfung mit je einer Öse erfolgte aus einer Abschwemmung der entsprechenden Schrägagarkultur mit 0,9% NaCl. Die Dichte der Abschwemmung wurde mit dem Havemann-Photometer gemessen und bewegte sich zwischen 80—130 Teilstrichen. Mikroskopische Ablesung des Bakterienwachstums nach 72 Stunden, Brutschrankaufenthalt bei 37°. Zwecks Unterscheidung zwischen bakteriostatischer und bakterizider Wirkung wurde nachträglich je eine Öse auf eine für den betreffenden Bakteriennachweis geeignete Platte ausgestrichen.

Für die Wachstumsversuche mit *Hefe* und *pathogenen Pilzen** (Epidermophyton Kaufmann-Wolf, Trichophyton cerebriforme) in Reagenzgläsern benutzten wir den Schrägagar nach Grütz[17] (Pepton 0,5, Malzextrakt 6,0, Glyzerin 0,5, NaCl 0,5, Agar 1,8 Aqua dest. 100,0). Ihm wurden die zu prüfenden Borsäure- und Glyzerinkonzentrationen vorher beigemischt. Die Beimpfung geschieht am besten mit einem schmalen spatelförmigen Instrument. Die Einhaltung der geeigneten Temperaturspanne von 20—32° C gelingt leicht dadurch, daß die Reagenzgläser auf der oberen Fläche eines auf 37° C eingestellten Brutschrankes aufgestellt werden.

Versuchsergebnisse.

Das *Verhalten der Wasserstoffionenkonzentration in Borsäurekomplexlösungen* im Vergleich zu Borsäure allein ist aus der Abb. 1

* Die Bakterienkulturen und die Bouillon wurden uns vom Hygienischen Institut Bonn (Dir. Prof. Dr. Eyer), die Hefe und Pilzausgangskulturen in ebenso liebenswürdiger Weise von der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten Bonn (Dir. Prof. Dr. Grütz) zur Verfügung gestellt.

ersichtlich. Bis zu starken Verdünnungen hinab ergibt sich für alle Komplexe eine höhere Azidität als für Borsäure allein. Glyzerin aktiviert am wenigsten, es folgt das unter sich etwa wirkungsgleiche Paar Borsäure-Glukose bzw. Galaktose und, am stärksten beeinflußt, das wiederum unter sich gleiche Paar Borsäure-Mannit bzw. -Sorbit. Mit steigender Verdünnung (wobei das molare Verhältnis beider Komponenten gewahrt bleibt) sinkt die Wasserstoffionenkonzentration ab.

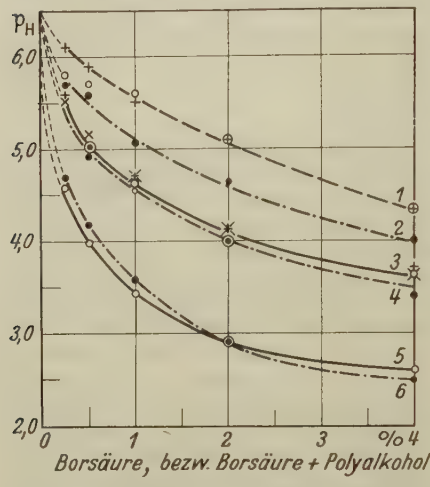


Abb. 1. Verhalten der Wasserstoffionenkonzentration in absteigenden Verdünnungen von Borsäure bezw. Diol-Borsäure. *1* Borsäure allein; *2* Glyzerin-Borsäure; *3* Galaktose-Borsäure; *4* Glukose-Borsäure; *5* Mannit-Borsäure; *6* Sorbit-Borsäure. Molares Verhältnis bei *5* und *6* = 1 : 1, bei *2*, *3* und *4* = 2 : 1.

An der Absterbezeit von *Kaulquappen* ließ sich dieselbe Reihenfolge der Aziditätssteigerung erkennen wie bei der p_H-Messung (Tabelle 1). In den Lösungen mit der stärksten Dissoziation von Wasserstoffionen gingen die Kaulquappen am raschesten zugrunde. Wiederum verhielten sich die Paare Borsäure-Mannit und -Sorbit bzw. Borsäure-Galaktose und -Glukose jeweils unter sich gleich. Bemerkenswert ist die Wirkung des am wenigsten p_H-aktivierenden Glyzerins, wahrscheinlich auf Grund

Tabelle 1. *Toxizität von Borsäure bzw. -komplexverbindungen an je 10 Kaulquappen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Borsäuregehalt. Die Ergebnisse der Kursivzahlen wurden nach Angleichung des p_H an das der Borsäure gewonnen.*

%	Borsäure	Borsäure-Mannit	Borsäure-Sorbit	Borsäure-Galaktose	Borsäure-Glukose	Borsäure-Glyzerin	Kontrolltiere*	Zeitpunkt
	0	10 *0*	10 —	0 *0*	0 *0*	0 *0*	0	48 Min.
	0	*2*	—	2 *1*	2 *2*	3 *5*	0	90 „
2	0	*4*	—	8 *6*	10 *5*	10 *9*	0	2 Stunden
	3	*8*	—	10 *7*	*8*	*10*	0	$2^1/_2$ „
	6	*10*	—	*10*	*10*		0	3 „
	0	4 *0*	2 —	0 *0*	0 *0*	0 *0*	0	2 „
1	0	10 *0*	10 —	5 *0*	1 *0*	9 *0*	0	4 „
	1	*0*	—	8 *4*	3 *5*	10 *9*	0	$7^1/_2$ „

* Kontrollversuche in Zuckerlösungen allein (entsprechend dem molaren Verhältnis).

seiner zusätzlichen Eigenwirkung. Dem Eintritt des Todes ging bei allen wirksamen Komplexkonzentrationen ein Stadium eigentümlicher Motilitätssteigerungen (feinschlägige Bewegungen bzw. Tremor des Schwanzes) und Übererregbarkeit voraus. Die Haut zeigte mehr oder weniger starke Zeichen einer Säureschädigung. Die Reihenfolge der Wirkungsstärke läßt zunächst an das Bild einer unspezifischen Säurewirkung denken. Als wir jedoch den Aziditätsfaktor ausschalteten, indem wir die p_H-Unterschiede gegenüber Borsäure mittels n-NaOH ausglichen, wirkten alle so eingestellten Komplexkonzentrationen immer noch giftiger als Borsäure allein (Tab. 1, Kursivzahlen). Der Zusatz von NaOH hat zwar den p_H-Faktor ausgeschaltet, aber doch im gesamten System bemerkenswerte Änderungen herbeigeführt. In dem Maße, wie zu unserem System NaOH zugesetzt wurde, reagierten die frisch gebildeten Borationen (wie es in den chemischen Vorbemerkungen näher ausgeführt wurde) mit dem Diol unter Komplexbildung weiter. So waren in unserem neuen Gleichgewicht erheblich mehr wirksame Komplexanitonen vorhanden. Die verbleibende Toxizitätszunahme ist möglicherweise der Wirkung dieser Komplexanionen zuzuschreiben.

Tabelle 2. *Vermehrung von Colpoda steini nach 2 Tagen.*

%	Borsäure	Borsäure-Galaktose	Borsäure-Glukose	Borsäure-Mannit	Borsäure-Sorbit
0,5	∅	∅	∅	∅	∅
0,25	(+)	∅	∅	∅	∅
0,125	+++	∅	∅	∅	∅

Kontrollen +++.

Bei der Prüfung an *Ziliaten (Colpoda steini)* war zwar die niedrigere Organisationsstufe zu berücksichtigen und damit eine geringere Empfindlichkeit zu erwarten. Es ließ sich aber auch hier zeigen, daß alle sauren Borsäurekomplexe giftiger wirkten, wenngleich die Abstufungen der einzelnen Komplexpaare nicht mehr hervortraten (Tabelle 2). Nach Angleichung der Azidität an die Borsäure ergab sich dieselbe Tatsache wie bei den Kaulquappen, d. h. es blieb eine restliche Toxizitätssteigerung der Komplexe bestehen (gleicher Befund wie in Tabelle 2), ein weiterer Beweis für die Bedeutung des Komplexanions. Osmotische Einflüsse scheiden aus, da die Gefrierpunktserniedrigungen unserer wirksamen Komplexverbindungen bei weitem nicht die osmotische Schwelle etwa von Glukoselösungen erreichten, bei der Ziliaten zugrunde gingen.

Die Prüfung an *Bakterien* (Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus) erbrachte für alle Borsäurekomplexe (Mannit, Sorbit, Galaktose, Glukose, Glyzerin) nicht

mehr die gekennzeichnete Wirkungssteigerung durch die p_H-Erhöhung oder den Einfluß der Komplexanionen. Die Borsäurekomplexe führten in den gleichen Grenzkonzentrationen zu Wachstumshemmungen wie Borsäure allein und waren somit in ihrer Wirkungsstärke der Borsäure keineswegs überlegen. Die häufigste Wachstumsgrenze lag nach 72 Stunden Einwirkung für Bact. coli, Bact. pyocyaneum und Staphylococcus aureus bei 1%, für Streptococcus haemolyticus bei 0,5% Borsäure bzw. -Komplex in Bouillon. Wurde das Nährmedium in seiner Zusammensetzung verschlechtert, indem z. B. der Bouillonanteil nur die Hälfte betrug (sog. „Halbbouillon"), dann verschob sich die Grenze für Bact. pyocyaneum und Staphylococcus aureus auf 0,5% herunter. Die maximale Aziditätssteigerung von p_H 4,0—3,5 spielte keine Rolle, weil Borsäure allein in diesem Konzentrationsbereich trotz erheblich geringerer Azidität (auf p_H etwa 5,5 bis 6,0) schon dieselbe antiseptische Wirkung ausübte.

Als Nebenbefund konnten wir bei Bact. pyocyaneum die Beobachtung machen, daß oberhalb 0,25% Borsäure- bzw. Borsäurekomplex der charakteristische blau-grüne Farbton der Pyocyaneuskulturen nicht mehr auftrat, öfters jedoch noch ein rötlich-violetter Farbton erkennbar blieb. Durch nachträgliches Zufügen von n-NaOH ließen sich die farblosen Kulturen blau-grün verfärben und auf Zusatz von n-HCl wieder entfärben. Die Bildung des Farbstoffes war also nicht gestört worden, dieser lag in dem sauren Milieu lediglich in seiner farblosen Stufe vor. Die Isolierung der beiden Komponenten des blau-grünen Pyocyaneus-Farbstoffes, und zwar des Pyocyanins in Chloroform, des Fluoreszins in Wasser, erlaubte, die Veränderungen im einzelnen festzustellen. Die wäßrige grüne Fluoreszinlösung entfärbte sich mittels n/10-HCl und wurde wieder grün durch Zusatz von n/10-NaOH. Die Pyocyanin-Chloroformlösung wurde durch Überschichten und Schütteln mit n/10-HCl allmählich farblos und in der letzteren sammelte sich ein rot-violetter Farbton an. Damit war bewiesen, daß Fluoreszin im sauren Milieu in seine farblose Stufe, Pyocyanin jedoch zu einem rot-violetten Farbstoff verändert worden war.

Der *Untersuchung von variierten Borsäure-Glyzerinmischungen* schenkten wir über das schon geprüfte molare Verhältnis (von Borsäure : Glyzerin = 1 : 2) hinaus besondere Beachtung, weil sie in der Praxis einen umfangreichen Platz einnehmen, und weil neben der Borsäure bzw. -Komplexwirkung dem Glyzerinanteil eine besondere Rolle zukommen konnte. Die an sich bekannte antiseptische *Wirkung von Glyzerin allein* auf Bakterien wurde unter zweierlei Bedingungen geprüft, einmal in dem ungünstigeren Medium „Halbbouillon", zum anderen unter den besseren Wachstumsbedingungen der Vollbouillon. Die Grenze der Wachstumshemmung lag für Colibakterien bei 20% (21,0%), für Pyocyaneum bei 28% (13,5%), für Staphylococcus aureus bei 28% (21,5%) und hämolytische Streptokokken bei 26% (15,5%) Glyzerin. (Die eingeklammerten Zahlen beziehen sich auf Glyzerin-Halbbouillon.) Die Zusammensetzung der Nährflüssigkeit spielt, abgesehen von dem Unterschied in der Empfindlichkeit des betreffenden

Stammes, somit eine wesentliche Rolle bei der Wirkung des Glyzerins, weniger für die anspruchsloseren Colibakterien als für die empfindlichen übrigen Bakterienarten. Aus den Versuchen, bei denen die nachträgliche Plattenüberimpfung angeschlossen wurde, ergab sich, daß sämtliche wachstumshemmenden Glyzerinkonzentrationen auf Pyocyaneus und Staphylococcus aureus bakterizid gewirkt hatten, bei Colibazillen und hämolytischen Streptokokken jedoch erst oberhalb 40% Glyzerin. Dem Glyzerin kommt also über seine Funktion als Vehikulum und Depot für Borsäure hinaus eine eigene bakterienschädigende Wirkung zu, die bei den betreffenden Konzentrationen zum Teil wohl auf einen osmotischen Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist.

Nachdem uns die Eigenwirkung des Glyzerins somit quantitativ bekannt war, suchten wir im folgenden den *Kombinationseffekt zwischen Borsäure und Glyzerin* zu erfassen. Dabei kamen wir für die Verhältnisse in Vollbouillon zu den in der Tabelle 3 angeführten Ergebnissen.

Tabelle 3.

	Total wachstumshemmende Grenzkonzentrationen					
	von Borsäure allein in Bouillon	von Glyzerin				
		in Bouillon	in Bouillon + Borsäure			
			0,125%	0,25%	0,5%	1,0%
Bacterium coli. . . .	>1%	20%	20%	16%	12%	2%
Bacterium pyocyaneum	1%	28%	28%	18%	12%	—
Streptococcus haemolyticus	0,5%	26%	26%	10%	—	—
Staphylococcus aureus	0,5%	28%	30%	30%	—	—

Deutlich erkennt man für Bact. coli, Bact. pyocyaneum und Streptococcus haemolyticus gegenseitige Verstärkerwirkungen. Für *Colibakterien* bedingten unwirksame Glyzerinkonzentrationen ab 2% aufwärts zusammen mit der wiederum sonst unwirksamen Borsäurekonzentration von 1,0% eine Wachstumshemmung. In ähnlicher Weise ergänzten sich auch die jeweils unwirksamen Konzentrationen von 12% Glyzerin aufwärts und 0,5% Borsäure. Für *Bact. pyocyaneum* verstärkten sich beide Komponenten deutlich ab 12% Glyzerin aufwärts +0,5% Borsäure, sowie ab 18% Glyzerin aufwärts +0,25% Borsäure. Für sich allein waren diese Konzentrationen jeweils unwirksam. Bei *Staphylococcus aureus* konnte man von einer gegenseitigen Verstärkung beider Anteile praktisch nicht mehr sprechen. Bei dem empfindlichen *Streptococcus haemolyticus* war ein Verstärkungseffekt für 10% Glyzerin aufwärts +0,25% Borsäure ebenfalls noch erkennbar. Die p_H-Kontrolle ergab bei all den in Frage kommenden Borsäurekonzentrationen

keine Werte über p_H 6,0 hinaus. Vergleicht man damit die bekannten p_H-Wachstumsgrenzen (Bact. coli etwa 4,0, Bact. pyocyaneum etwa 5,0, Staphylococcus aureus etwa 4,5, Streptococcus haemolyticus etwa 5,5), dann geht aus unseren Versuchen klar hervor, daß die Verstärkung der Borsäurewirkung durch Glyzerinzusätze nicht auf einer Aziditätssteigerung beruhen kann, sondern andere Ursachen haben muß. Es ist hier unter anderem an die antiseptische Eigenwirkung des Glyzerins zu denken.

Aus der Gruppe der Blastomyzeten wählten wir *Hefe* aus. Die Tabelle 4 zeigt, daß sie sich in einer ganz ähnlichen Weise gegenüber der

Tabelle 4.

	Total wachstumshemmende Grenzkonzentrationen					
	von Borsäure allein in Grützagar	von Glyzerin				
		in Grützagar	in Grützagar + Borsäure			
			0,125%	0,25%	0,5%	1,0%
Epidermophyton pedis (Kaufmann-Wolf)	>1%	16%	2%	2%	2%	2%
Trichophyton cerebriforme	0,5%	14%	12%	2%	—	—
Hefe	1,0%	20%	20%	18%	10%	-

Kombination von Glyzerin und Borsäure verhielt wie die Bakterien. Die waschtumshemmende Grenzdosis lag nach 5 Tagen für Borsäure allein bei 1%, für Glyzerin bei 20%. Die Kombination der unwirksamen Konzentrationen von 0,5% Borsäure und von Glyzerin ab 10% bewirkte eine totale Wachstumshemmung. Auch mit 0,25% Borsäure war noch ein schwacher Effekt erkennbar. Im Sinne einer partiellen Wachstumshemmung verstärkten sich aber schon unwirksame Glyzerinkonzentrationen ab 2% mit unwirksamen Borsäurekonzentrationen ab 0,5%.

Die von Klingmüller stammende und von Marchionini[18] ausgebaute Säurebehandlung intertriginöser Epidermophytien der Zehen enthält neben anderen Mitteln auf Borsäure. Wir untersuchten aus der Gruppe der Dermatomyceten das *Epidermophyton pedis* (Kaufmann-Wolf), das in den obersten Epithelschichten solcher Hautstellen wächst, deren p_H alkalischer ist als der sog. Säuremantel der übrigen Haut. Nach Schmidt[19] bietet der Säureanteil der in Frage kommenden Säuerungsmittel (Salzsäurealkohol, Normolaktol, Borsäure u. a.) allein keinen Schutz vor pathogenen Pilzen. Dies ergab sich auch in unseren Versuchen mit Epidermophyton pedis für die Wirkung von Borsäure allein (Tabelle 4). Zwar war nach 40 Tagen das Wachstum gegenüber der Kontrolle in allen Konzentrationen eingeschränkt, aber nicht unterbunden. Die völlig wachstums-

hemmende Borsäurekonzentration lag erst oberhalb 1%. Bemerkenswerterweise befand sich die wirksame Glyzeringrenzkonzentration mit 16% erheblich tiefer als bei den Bakterien. Sobald die unwirksamen Glyzerinkonzentrationen (schon ab 2%) mit den unwirksamen Borsäurekonzentrationen kombiniert wurden, ergab sich in allen Fällen eine völlige Aufhebung des Wachstums. Für diese Verstärkerwirkung unwirksamer Einzelkomponenten konnte die mögliche Aziditätssteigerung nicht verantwortlich gemacht werden. Da Pilze ein saures Milieu bevorzugen, waren von vornherein alle Nährböden auf ein p_H von 5,2—5,4 eingestellt worden. Die Wirkungssteigerung läßt eher wieder an die erhöhte Aktivität der entstandenen Borsäurekomplexanionen denken.

Auch bei *Trichophyton cerebriforme* sahen wir noch grundsätzlich das gleiche Bild. Dieser Pilz besaß nach 41 Tagen gegenüber Glyzerin etwa die gleiche Empfindlichkeit wie Epidermophyton pedis (Tabelle 4). Die wirksame Grenzkonzentration wurde mit 14% Glyzerin erreicht. Die Wirkung der Borsäure war stärker als bei allen übrigen untersuchten Mikroorganismen. Bei 0,5% trat völlige Wachstumshemmung ein. Die Kombination der unwirksamen Glyzerinkonzentrationen mit der unwirksamen Borsäurekonzentration von 0,25% ergab eine ähnliche Verstärkerwirkung wie bei Epidermophyton pedis.

Besprechung.

Beim Mischen von Borsäure mit aliphatischen Polyoxyverbindungen beobachteten wir zwei pharmakologisch bemerkenswerte Erscheinungen. Die eine bestand in einer erheblichen Aziditätssteigerung, die sich an der Absterbezeit von Kaulquappen und an der Vermehrungsfähigkeit von Colpoda steini nachweisen ließ. Bei der anderen handelte es sich um eine auch nach Ausschaltung der Unterschiede in der Wasserstoffionenkonzentration noch verbleibende Toxizitätszunahme. Diese trat sowohl nach Angleichung des p_H der Komplexlösungen an die der Borsäure (bei Kaulquappen und Colpoda steini), als auch nach Wahl eines für Borsäure und Borsäure-Glyzerin gleich sauren Milieus in Erscheinung (bei pathogenen Pilzen). Sie kann sowohl einer erhöhten Toxizität der Komplexanionen selbst (Schlepperwirkung?), als auch einer nach NaOH-Zusatz erfolgten Vermehrung der Komplexanionenkonzentration (bessere Fähigkeit der neu entstandenen Borationen zur Komplexbildung) zugeschrieben werden. An Bakterien ließ sich die erwähnte Toxizitätssteigerung nicht nachweisen. Dies bedeutet, daß die antibakterielle Borsäurewirkung durch Komplexbildung mit Polyoxyverbindungen nicht gesteigert wird. Hat somit der beliebte Zusatz von Glyzerin zu Borsäure oder Borax überhaupt einen praktischen Wert? Es handelte sich bei den erwähnten

Befunden noch um Zusätze geringer Mengen von Polyoxyverbindungen. In praxi liegen dieselben bedeutend höher.

Der Vorteil des Glyzerins besteht zunächst in seiner Wirkung als Lösungsmittel. Es erlaubt, höhere Borsäurekonzentrationen einzustellen als in Wasser allein und ermöglicht deshalb eine Art Depottherapie. Hinzu tritt eine nicht unbeträchtliche antiseptische Eigenwirkung des Glyzerins selbst. Ab 28% wirkte es in unseren Versuchen wachstumshemmend, in hohen Konzentrationen (oberhalb 40%) sogar bakterizid, allerdings nur bei längerem Kontakt. Über die Möglichkeit einer additiven Verstärkung hinaus sind unwirksame Glyzerinkonzentrationen in der Lage, unwirksame Borsäurekonzentrationen zu wachstumshemmenden Mischungen zu ergänzen, sowohl bei Bakterien, als auch bei Pilzen. Wenn wir also in der Praxis der Borsäure weiterhin ihren weniger qualitativ hochstehenden als umfangreichen Platz belassen wollen, dann ist der Zusatz von Glyzerin nicht nur durch seine Wirkung als flüssiges Vehikulum und Lösungsmittel, sowie durch seine Fähigkeit, auf schmerzgespannte Membranen entquellend und lindernd zu wirken, gerechtfertigt, sondern auch durch seine antiseptische Eigen- und Verstärkerwirkung. Die Verwendung des Glyzerins als Hautpflegemittel dürfte wegen seiner antiseptischen Eigenschaften wie auch seiner Eindringungsfähigkeit in die Hautspalten und -poren gerade für den Arzt (Chirurgen) wertvoll sein.

Als Mittel für die Säuremanteltherapie besitzt Borsäure allein kaum einen praktischen Nutzen, wohl aber nach Zusatz von Glyzerin. So maßen wir bei der Borsalbe nach Fürst (s. Czetsch-Lindenwald und Schmidt-La Baume[20], S. 195) die aus Acid. boricum, Glycerinum āā 4,0, Vaselinum und Lanolinum āā 20,0 zusammengesetzt ist, ein p_H von 4,1—4,2. Noch besser wäre der Zusatz der anderen Polyoxyverbindungen, insbesondere von Mannit und Sorbit. Immerhin ist zu bedenken, daß für die „Säuremanteltherapie" genügend sonstige Säuren zur Verfügung stehen.

Zum Schlusse möge auf die Möglichkeit sonstiger Komplexbildungen hingewiesen werden. In unserem Organismus wie auch in Mikroorganismen gibt es genug komplexfähige Polyoxyverbindungen. Von Pfeiffer, Hallman und Gersch[21] wurde bei Borsäurevergiftung eine Speicherung der Borsäure nicht etwa in den Lipoiden, sondern durch Komplexbildung mit Glyzerin erörtert. Man dürfte auch an eine Komplexbildung und damit an störende Eingriffe am gesamten Molekül bei all den Fermenten denken, in denen Pentosen eingebaut sind, z. B. bei Co-Dehydrase I (Co-Zymase), Co-Dehydrase II, Lactoflavin, beim gelben Atmungsferment, weiterhin bei Adermin usw. Adermin und Lactoflavin sind für manche Mikroorganismen Wuchsstoffe, so bei bestimmten Milchsäurebakterien, Pilzen und hämolytischen Streptokokken. Könnte bei der Borsäurewirkung auch die Blockierung der Askorbinsäure eine Rolle spielen? Askorbinsäure

begünstigt die Vermehrung vieler Mikroorganismen, es ermöglicht vor allem obligat Anaeroben das Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff. Auch das inaktive Inosit (Mesoinosit) ist in Betracht zu ziehen. Dieses bildet für Hefe und verschiedene andere Mikroorganismen einen notwendigen Wachstumsfaktor. Es erhebt sich die Frage, ob nicht nur die toxische, sondern auch die antiseptische Wirkung der Borsäure auf der Komplexbildung mit solchen wichtigen Stoffen beruht.

Zusammenfassung.

Die pflanzenbiologisch bedeutsame Fähigkeit der Borsäure, Komplexe zu bilden, erstreckt sich grundsätzlich auf alle Polyoxyverbindungen mit mindestens 2 Oxygruppen, sowohl aliphatischer, als auch aromatischer Natur. In Mischungen von Borsäure (bzw. Borat) mit je einem der aliphatischen Polyoxyverbindungen Mannit, Sorbit, Galaktose, Glukose, Glyzerin wurde die gegenseitige Beeinflussung der beiden Reaktionspartner an verschiedenen Organismen untersucht.

Die Azidität der freien Borsäure läßt sich durch Zusatz der genannten Polyoxyverbindungen so steigern, daß die p_H-Erhöhung sich an Kaulquappen und Ziliaten in einer Toxizitätssteigerung (und zwar in derselben Reihenfolge wie bei der p_H-Messung) nachweisen läßt.

Nach Angleichung des p_H an das der Borsäure mittels NaOH blieb über dem unspezifischen H-Ioneneinfluß hinaus eine Toxizitätssteigerung bestehen, die der vermehrten Komplexbildung durch die neu gebildeten Borationen zugeschrieben wird. Die eben genannten Veränderungen bewirkten an Bakterien (Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus) in vitro keine Toxizitätssteigerung. Die antiseptische Borsäurewirkung wurde durch Zusatz obiger Polyoxyverbindungen also nicht erhöht.

Glyzerin besaß dagegen an Bakterien und noch mehr an Hefe und pathogenen Pilzen (Epidermophyton pedis Kaufmann-Wolf, Trichophyton cerebriforme) eine erhebliche, in hohen Konzentrationen bei längerer Einwirkung bakterizide Eigenwirkung.

Durch diese antiseptische Eigenwirkung des Glyzerins ergänzten sich unwirksame Glyzerinkonzentrationen mit unwirksamen Borsäurekonzentrationen zu wirksamen antiseptischen Mischungen, und zwar gegenüber Bakterien, Hefe und den genannten Pilzen. Die Verstärkerwirkung gegenüber den Pilzen läßt ebenfalls eine erhöhte Wirksamkeit der Komplexanionen als denkbar erscheinen. Die Möglichkeit der Komplexbildung der Borsäure in niederen und höheren Organismen mit geeigneten Polyoxyverbindungen wurde kurz erörtert.

Literatur.

[1] Kuhn, R.: Chemie **56**, 16 (1943). — [2] Takagi, S.: J. pharmac. Soc. Japan **1926**, Nr 529, 27. — [3] Gabriel, B. u. L. Silberstein: Ann. Inst. Pasteur, Par. **64**, 456 (1940). — [4] Partridge, W.: Analyst **52**, 401 (1927). — [5] Scott-Dodd: Analyst **52**, 459 (1927). — [6] Dunn, J. T. and H. Ch. L. Bloxam: Analyst **54**, 28 (1929). — [7] Kuhn, R.: Chemie **55**, 248 (1942). — Wien. Chemiker **46**, 1 (1943). — [8] Kuhn, R., J. Löw u. F. Möwus: Naturw. **30**, 407 (1942). — [9] Tauböck, K.: Naturw. **30**, 439 (1942). — [10] Thomson, R. T.: J. Soc. chem. Ind. **12**, 432 (1893). [11] Jörgenson, G.: Z. angew. Chem. **1897**, 5. — [12] Boeseken, J.: Ber. dtsch. chem. Ges. **46**, 2612 (1913). — [13] Hermans, P. H.: Z. anorg. allg. Chem. **142**, 83 (1925). — [14] Schäfer, H.: Z. anorg. allg. Chem. **247**, 96 (1941). — [15] Voicu, J. u. E. Axente: Bull. Soc. chim. România **12**, 61 (1930). — [16] Tsuzuki, Y.: Bull. chem. Soc. Japan, **16**, 23 (1941). — [17] Grütz, O.: Siehe bei H. C. Plant u. O. Grütz: Handbuch der pathogenen Organismen, Bd. V/1, S. 210 (1928). — [18] Marchionini: Derm. Z. **56**, 248 (1929). — [19] Schmidt, P. W.: Arch. Derm. (D.) **182**, 102 (1941). [20] Czetsch-Lindenwald, H. v. u. F. Schmidt-La Baume: Salben, Puder, Externa. Berlin: Springer 1944. — [21] Pfeiffer, C. C., E. L. F. Haliman u. U. Gersh: J. amer. med. Assoc. **128**, 266 (1945).

Doz. Dr. H. F. Zipf, (22c) Bonn, Hindenburgstr. 147.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 67—70 (1949).

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G. Berlin (Prof. Dr. H. Ruska).

Über die Natur der sog. Cabotschen Ringkörper der Erythrozyten*.

Von

Bruno Lindemann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. September 1948.)

In den normalen Erythrozyten werden vereinzelt eigenartige gewundene Schleifenbildungen und ringförmige Strukturen lichtmikroskopisch beobachtet, die im Blute schwerer Anämien an den polychromatischen Erythrozyten vermehrt auftreten, welche nach Cabot als Cabotsche Ringkörper bezeichnet werden. Häufig enthält die rote Blutzelle neben den Ringgebilden auch Jolly-Howellsche Körper und bei Giemsafärbung rote oder auch blaue basophile Punktierung. Die ringförmigen Stukturen im Erythrozyten erscheinen dabei als leuchtend rote Bänder. Cabot und Naegeli fanden auch vereinzelt blaugefärbte Ringe. Bei schlechter Anfärbung lassen sich die Ringe als negative Aussparungen auffinden. Durch Aufsplitterung und Untergang der Ringe kann nach Naegeli eine grobe rote basophile Punktierung im Erythrozyten entstehen. Diese eigenartigen Strukturen im Erythrozyten werden im allgemeinen als Kernwandreste gedeutet. Nach Schilling handelt es sich um liegengebliebene Teile eines pathologisch verstärkt gebildeten Zellteilungsapparates. Da Ringkörper in Erythrozyten aus blutbildenden Organen, menschlichen und tierischen Embryonen nie beobachtet wurden, wird von Naegeli darin ein Beweis für eine pathologische Erscheinung der Kernauflösung gesehen. Dem Einwand von Russow, daß es sich vielleicht um Artefakte handele, wird von Naegeli entgegengestellt, daß die Ringkörper sich zuweilen aus gleich großen Körnern zusammensetzen und daß gelegentlich im Plasma freie Ringe vorkommen. In diesem Zusammenhang ist die Mitteilung von Tsamboulas und Malikiosis von besonderer Bedeutung, die einen Cabotschen Ringkörper im Plasma eines Erythroblasten, der durch Sternalpunktion bei einem Typhuskranken gewonnen wurde, beschreiben, bei dem der Kern des Erythroblasten vollständig intakt war, so daß gegen die karyogene Genese der ringförmigen Strukturen der Erythrozyten berechtigte Zweifel erhoben wurden.

Bei der lichtmikroskopischen Durchmusterung der Präparate von osmotisch partiell hämolysierten Erythrozyten stießen wir an

* Als Vortrag gehalten am 23. 4. 49 auf der 1. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie.

zahlreichen Erythrozyten auf eigenartige, zumeist in der großen zentralen Aufhellungszone gelegene Strukturen, welche als CABOTsche Ringkörper anzusprechen waren. Die Ringe waren manchmal geschlossen, bildeten Schleifen, hatten auch Achterformen oder waren unregelmäßig

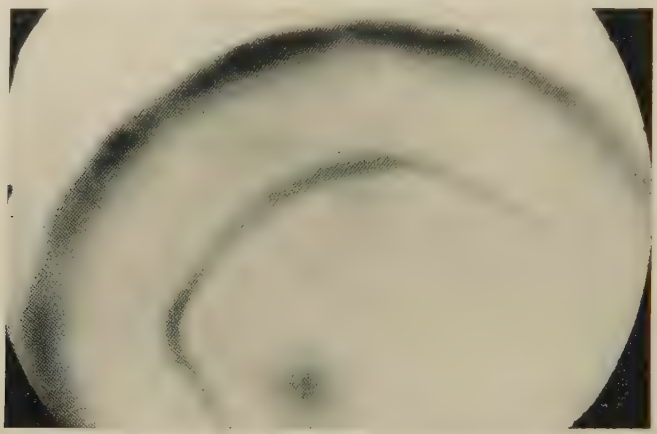


Abb. 1. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit glatter ringförmiger Faltenbildung. Osmiumfixation. El. opt. 1: 18000.

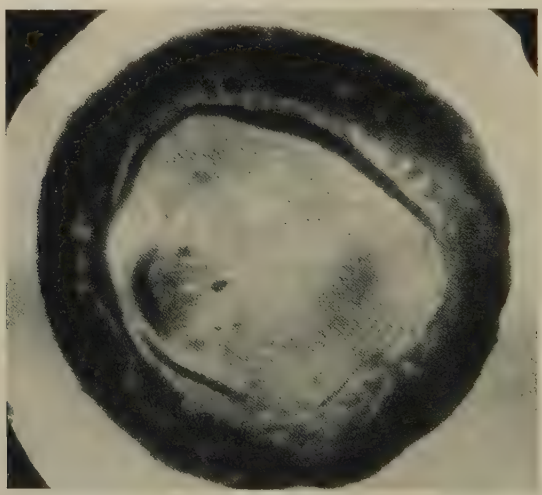


Abb. 2. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit großen ringförmigen Faltenbildungen, welche die zentrale Aufhellungszone scharf umgrenzen. Osmiumfixation. El. opt. 1: 9000.

verzweigt und aufgesplittert, auch gedoppelt. Vereinzelt fanden wir gekörnte Ringkörper. Elektronenoptisch konnten an allen diesen Zellen diese eigenartigen Ringbildungen eindeutig als Membranfalten der Erythrozytenhülle, in denen auch manchmal Hämoglobinreste eingeschlossen waren, erkannt werden. Die abgebildeten partiell hämolysierten Erythrozyten mit Membranfältelung sind Beispiele für solche

sog. Cabotschen Ringkörper der Erythrozyten. Die lichtmikroskopisch beobachtete grobe und feine Körnelung der Ringe konnte in allen

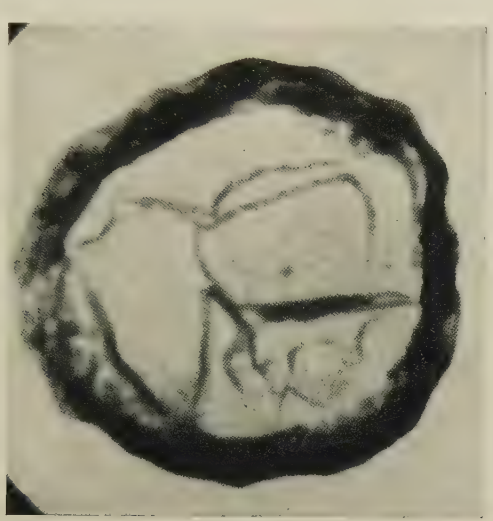


Abb. 3. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit verzweigten Membranfalten. Osmiumfixation. El. opt. 1: 9000.

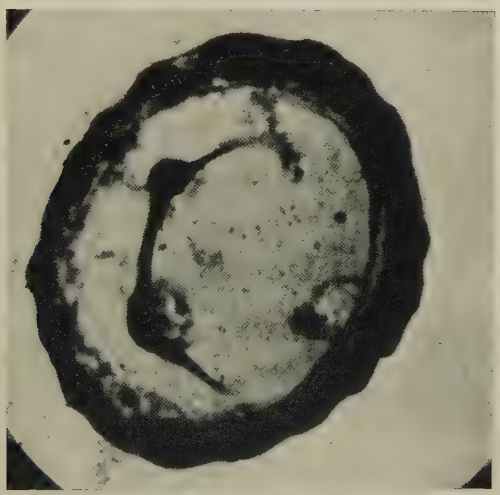


Abb. 4. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit Falten, in denen Hämoglobinreste eingeschlossen sind. Osmiumfixation. El. opt. 1: 9000.

diesen Fällen als in den Membranfalten liegende Hämoglobinassoziate von verschiedener Größe identifiziert werden.

Die Faltenbildung der Membran mit der im Finalstadium einer osmotischen Hämolyse eintretenden kaum meßbaren Dehnung derselben in ursächliche Beziehung zu setzen, dafür ist bei der hohen

Elastizität und Dehnbarkeit der Hülle nur eine geringe Wahrscheinlichkeit gegeben. Da diese sog. Cabotschen Ringkörper als häufiger Befund an partiell hämolysierten, d. h. hämoglobinarmen Erythrozyten nachzuweisen sind und diese Ringgebilde gerade im Blute schwerer Anämien an den Erythrozyten vermehrt auftreten, bei denen die Hämoglobin-Membranrelation in kennzeichnender Weise verändert ist, liegt es nahe, hier die Parallele zu ziehen und zwischen der Hämoglobinarmut der Erythrozyten und dem Auftreten von Ringstrukturen einen ursächlichen Zusammenhang anzunehmen, daher auch für alle diese sog. Cabotschen Ringkörper das gleiche morphologische Substrat zugrunde zu legen und sie als Membranfalten der Erythrozytenhülle zu deuten. Diese zarte Membranfältelung tritt dann auf, wenn der Hämoglobininhalt, wie es z. B. am partiell hämolysierten Erythrozyten der Fall ist, reduziert ist. Die feinen Faltenschläge der Hülle, die physiologisch unter einem bestimmten Spannungszustand steht, bilden sich mit Vorliebe in der hämoglobinleeren zentralen Eindellungszone aus; durch die Auftrocknung und Fixation werden die der Membran sich anlegenden Falten verfestigt und ergeben dann jene eigenartigen Strukturbilder, die lichtmikroskopisch als sog. Cabotsche Ringkörper in Erscheinung treten.

Zusammenfassung.

Die an osmotisch partiell hämolysierten Erythrozyten auftretenden Cabotschen Ringkörper, welche im allgemeinen als Kernmembranreste im Erythrozyten aufgefaßt werden, wurden elektronenoptisch eindeutig als Membranfalten der Erythrozytenhülle erkannt. Da an hämoglobinarmen Erythrozyten diese Ringkörper vermehrt auftreten, wird angenommen, daß bei reduziertem Zellinhalt in der zentralen Eindellungszone der physiologisch unter einem bestimmten Spannungszustand stehenden Membran kleine Faltenwürfe auftreten, die dann im Lichtmikroskop als sog. Cabotsche Ringkörper in Erscheinung treten.

Literatur.

Cabot: J. med. Res. (Am.) **2** (1903). — Ferrata, A.: Fol. hämat. (D.) **9**, 253. — Ferrata, A., u. G. Viglioli: Fol. hämat. (D.) Orig. **11**, 82, 315. — Gabriel: Dtsch. Arch. klin. Med. **92**, 602 (1908). — Golgi: Haematologica (It.) **2**, 125 (1921). Juspa, V.: Fol. hämat. (D.) **17**, 429 (1913). — Löwit, M.: Beitr. path. Anat. **42**, 559 (1907). — Naegeli, O.: Ausführungen und Abbildungen in Ehrlichs Anämie, 2. Aufl. 1909. — Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. Berlin: Springer 1931. — Nissle: Arch. Hyg. (D.) **61**, 151. — Russow, K. E.: Dtsch. Arch. klin. Med. **102**, 210 (1911). — Schilling, V.: Das Blutbild. Jena: Gustav Fischer 1943. — Klin. Wschr. **1928**, 17; **1929**, 2417. — Schleip, K.: Dtsch. Arch. klin. Med. **91**, 449 (1907). — Sluka, E.: Dtsch. Arch. klin. Med. **93**, 577. — Wien. klin. Wschr. **1908**; 243. — Tsamboulas, N., u. X. Malikiosis: Dtsch. Arch. klin. Med. **184**, 183 (1939).

Dr. B. Lindemann, (24) Hamburg, Krankenhaus Sankt Georg.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 71—81 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Der Einfluß verschiedener Ernährungszustände auf die Glykogenbildung im überlebenden Zwerchfell- und Fettgewebe der Ratte.

Von

Franz X. Hausberger und Orest Jachtorowycz.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. August 1948.)

Durch Hofmeister[1] wurde in dem gleichen Jahr, in dem Mering und Minkowski den experimentellen Pankreasdiabetes entdeckten, für eine bestimmte Art der Glukosurie der Name „Hungerdiabetes" geprägt. Schon Claude Bernard[2] war bekannt, daß bei längere Zeit hungernden Hunden nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit eine Zuckerausscheidung auftreten kann. Adlersberg und Porges[3] und Sweney[4] konnten zeigen, daß auch nach einer fettreichen, kohlenhydratarmen Fütterungsperiode die Zuckertoleranz so sehr erniedrigt ist, daß nach einer Kohlenhydratbelastung ausgesprochen diabetische Blutzuckerwerte zu beobachten sind, während bei gemischter Kost die Werte unter sonst gleichen Bedingungen normal sind. Bereits vorher hatte Bang[5] dieses veränderte Verhalten des Blutzuckers nach einer vorausgegangenen Hungerperiode festgestellt. Die Glukosurie nimmt nach Hofmeister mit der Dauer des Nahrungsentzuges zu, so daß schließlich selbst bei einer Gabe von 2 g/kg reichlich Zucker im Urin nachgewiesen werden kann. Himsworth[6] wies darauf hin, daß das Ausmaß der beim Menschen nach fettreicher Ernährung und nachfolgender Kohlenhydratgabe auftretenden erheblichen Blutzuckersteigerung abhängig ist von dem Gehalt an Kohlenhydraten in der vorhergehenden Kost. Bei gesunden Personen ist nach Sweeney und Mitarbeitern[7] die tägliche Aufnahme von 25—30 g Glukoseäquivalenten notwendig, um eine normale Kohlenhydrattoleranz beim Menschen aufrechtzuerhalten. Daß nicht eine beschleunigte Resorption die Ursache dieses „diabetischen" Verhaltens ist, wurde von Vignard und Karr[8] durch intravenöse Zufuhr bewiesen. Auch Hofmeister konnte zeigen, daß die Resorption im Hunger nicht gesteigert ist. Nach neueren Untersuchungen ist sie sogar vermindert[9].

Es hat nicht an Erklärungsversuchen für dieses diabetesähnliche Verhalten gefehlt. Denkbar sind zwei verschiedene Mechanismen als Ursache. Erstens eine Herabsetzung der Speicherfähigkeit der Leber, zweitens eine verminderte Verwertung des Zuckers durch die Gewebe.

Soskin und Mitarbeiter[10, 11] sind der Ansicht, daß die diabetische Zuckertoleranz im Hunger und bei kohlenhydratarmer-fettreicher Kost lediglich durch eine geänderte Reaktionsweise der Leber zustande kommt. Sie speichert normalerweise bekanntlich Zucker, sobald dessen Gehalt im Blut eine gewisse Höhe erreicht hat, und gibt ihn bei Erniedrigung des Blutzuckerspiegels wieder ab. Die Blutzuckerschwelle, bei der dieser Mechanismus in Tätigkeit tritt, ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, z. B. den Hormonen. Durch den Hunger oder den Mangel an exogenen Kohlenhydraten soll nun die Leber so sehr mit der Bildung von Zucker aus Nichtkohlenhydraten belastet sein, daß damit ihre Speicherfunktion für die Glukose weitgehend unterbunden ist. Es zeigen sich dann die gleichen Erscheinungen wie nach einer Zuckerzufuhr beim entleberten Tier, es entsteht ein „Überlaufdiabetes", die Belastungskurve wird diabetisch und es kommt gegebenenfalls zur Glukosurie. Damit besteht nach dieser Ansicht ein grundsätzlicher Unterschied zwischen dem Hungerdiabetes und dem Pankreasdiabetes, der nach Soskin — entsprechend der Überproduktionstheorie — durch eine vermehrte Zuckerproduktion in der Leber bedingt sein soll. Nach wiederholter Kohlenhydratzufuhr stelle sich die Leber auf eine normale Speicherfunktion um.

Hofmeister nahm eine verminderte Assimilationsfähigkeit als Ursache an. Entsprechend der damals gültigen Anschauung über das Wesen des Diabetes ist darunter eine verminderte Verwertung des Zuckers durch die Gewebe zu verstehen. Diese Anschauung wird gestützt durch die Beobachtung von Dann und Chambers[12], daß bei Hunden nach längerer Hungerzeit und einer nachfolgenden Kohlenhydratgabe sowohl die Steigerung des Sauerstoffverbrauches, als auch die des respiratorischen Quotienten ausbleiben und gleichzeitig eine Hyperglykämie und Glukosurie auftreten. Insulin ist auch in großen Dosen nur von geringem Einfluß auf dieses Verhalten und selbst enorme Dosen bewirken keine völlige Wiederherstellung. Bei Zufuhr von täglich 50 g Traubenzucker steigen der respiratorische Quotient und der Sauerstoffverbrauch langsam an und erreichen am 5. Tag wieder den Wert vor der Versuchszeit. Himsworth[6, 13] dagegen glaubt aus dem Verhalten der arteriovenösen Blutzuckerdifferenz beim Menschen unter fettreicher Kost schließen zu dürfen, daß die Glukoseverwertung nicht gestört ist. Bei der gleichen Person zeigt nach der kohlenhydratarmen Ernährung zwar der Blutzucker einen hohen Anstieg, jedoch ist die arteriovenöse Spannungsfläche annähernd ebenso groß wie nach kohlenhydratreicher Fütterung im Anschluß an die Belastung. Der erhöhte Blutzucker soll durch das stärkere Gefälle Blut → zuckerverwertende Zellen die bei fettreicher Ernährung verringerte Avidität der Gewebe gegenüber der Glukose ausgleichen, so daß die Verwertung schließlich unverändert bleibt.

Auch Untersuchungen an eviszerierten oder entleberten Präparationen, bei denen der Zuckerverbrauch gefütterter Tiere mit dem hungernder verglichen wurde, haben keine eindeutige Beurteilung erfahren. Bei Kaninchen wird der Glukoseverbrauch in den ersten Hungertagen nach Bergmann und Drury[14] um etwa 50% vermindert und sinkt mit zunehmender Hungerdauer weiter ab. Am 4. Tag sollen nach den Berechnungen von Drury[15] nicht mehr als 10% des Energiebedarfs aus der verbrannten Glukose herrühren. Soskin dagegen bestreitet auf Grund seiner experimentellen Untersuchungen die Richtigkeit dieser Angaben.

Nach den vorliegenden Forschungsergebnissen ist es zwar wahrscheinlich, daß im Hunger die Fähigkeit der Gewebe, Zucker zu verwerten, herabgesetzt ist, jedoch kann diese Frage noch nicht als eindeutig entschieden angesehen werden. Im Hinblick auf die Schlüsse, die aus vergleichenden Untersuchungen über den Zuckerverbrauch eviszerierter diabetischer und gesunder Tiere, die beide vor dem Versuch hungerten, gezogen wurden, erschien es angebracht, mit anderer Methodik zu untersuchen, ob die Glukoseverwertung im Hunger tatsächlich vermindert ist. Unter Kohlenhydratverwertung wird heute allgemein die Oxydation des Zuckers und seine Umwandlung in andere körpereigene Substanzen, besonders im Glykogen und Fett, verstanden. Aus technischen Gründen mußten wir uns auf die Untersuchung der Glykogenbildung beschränken. Nach einer kohlehydratreichen Fütterung wird ein Teil des Zuckers als Glykogen abgelagert, zum Teil in der Leber, zum größeren Teil in der Muskulatur. Diese Umwandlung gehört zu den bestuntersuchten Vorgängen im Kohlenhydrathaushalt. In den vergangenen Jahren haben Stetten und Boxer[16] die Untersuchungsergebnisse von Hausberger[17] bestätigt, daß im Organismus eine dauernde Synthese von Kohlenhydraten zu Fett erfolgt. Sie konnten zeigen, daß bei Ratten täglich von den verfütterten Glukoseäquivalenten etwa 3% als Glykogen abgelagert werden, jedoch die 10fache Menge in Fett umgewandelt wird. Dies Synthese soll nach Hausberger im Fettgewebe selbst erfolgen. Ihr geht immer eine geteigerte Glykogenbildung voraus bzw. parallel[18]. Es ist wahrscheinlich, daß diese Zunahme als ein Maßstab für die Fettneubildung gelten kann. Dafür spricht die Beobachtung, daß bei Mästung vorher hungernder Tiere mit Kohlenhydraten mit dem Glykogengehalt zugleich der respiratorische Quotient des isolierten Fettgewebes weit über 1 ansteigt[19] und bei der Insulinmast Glykogen und Fett in den Depots zunehmen[20]. Auch bei der erstmaligen Fettablagerung in den Depots neugeborener Tiere ist dieser gleiche Zusammenhang zu beobachten[21]. Parallel mit der lokalen Fettsynthese bei Kohlenhydratmast geht eine Zunahme der Gewebsdiastase[22] und Glyzerophosphatase[17a]. Eine Zunahme der Diastase erfolgt auch bei

der vermehrten Fettablagerung in den entnervten Fettorganen, die ebenso wie die Vermehrung anderer kohlenhydratspaltender Fermente immer zusammen mit der Glykogensteigerung auftritt[17b]. Dieser enge Zusammenhang zwischen Glykogenablagerung im Fettgewebe und Fettvermehrung kann daher mit großer Wahrscheinlichkeit als Ausdruck einer lokalen Fettsynthese gelten. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir nun von diesen Gesichtspunkten aus im überlebenden Muskel- und Fettgewebe von Ratten unter verschiedenen Ernährungsbedingungen dessen glykogenbildende Fähigkeit. Bekannt ist, daß isoliertes Muskelgewebe in zuckerhaltiger Suspensionsflüssigkeit Glykogen bilden kann[23].

Methodik.

Als Versuchstiere benutzten wir erwachsene männliche Ratten. Die Fütterung erfolgte mit Küchenabfällen, Brot und Gemüse. Sie war durch zeitbedingte Umstände nicht völlig gleichmäßig und nicht maximal. Den Hungertieren wurde eine gewisse Zeit die Nahrung völlig entzogen und sie dann zur Präparation benutzt. Ein anderer Teil bekam nach der erwünschten Gewichtsabnahme täglich so viel Futter, daß das verminderte Körpergewicht aufrechterhalten wurde. Die letzte Fütterung geschah immer 24 Stunden vor der Präparation. Da das Futter innerhalb der ersten 3—4 Stunden aufgefressen wurde und die Assimilationsphase spätestens 4 Stunden nachher beendet ist, sind diese Tiere als Hungertiere zu betrachten, da dann der Stoffwechsel aus den abgelagerten Reserven bestritten werden muß. Die geringen Glykogenreserven der Ratte sind innerhalb einiger Stunden aufgebraucht, als weiteres Brennmaterial wird dann vorwiegend Fett benutzt[24]. Ein anderer Teil der Hungertiere erhielt 24 Stunden vor dem Versuch Brot und Grieß- oder Haferflockenbrei. Die Ratten wurden durch Kopfschlag getötet, sofort die Karotiden durchtrennt und entbluten lassen. Möglichst schnell erfolgte die Entnahme zuerst des Zwerchfells. Dieses wurde nach Entfernung des sehnigen Teils in eine rechte und linke Hälfte getrennt und jedes Stück auf der Torsionswaage gewogen. Die eine Hälfte wurde sofort in 2 cm^3 30%ige heiße Kalilauge gebracht, die andere in 40 cm^3 einer von Seckel[25] geringfügig modifizierten Ringer-Phosphatpuffer-Glukoselösung (p_H 7,5, 300 mg-% Glukose). Die vorgewärmte Flüssigkeit mit dem Gewebe wurde verschlossen in den Thermostaten (37°) gestellt und dort unter häufigem Schütteln 2 Stunden belassen. Die Glykogenbestimmung erfolgte weiter nach Somogyi[26]. Sofort nach der Präparation des Zwerchfells wurde dann der Hodenfettkörper entnommen, der lamellenartige periphere Teil abgetrennt und nach dem Vorschlag von Scoz[27] zunächst für 24 Stunden in 96%igen Alkohol gegeben, der periphere Teil des anderen kam in die Suspensionsflüssigkeit. Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind Glukose-Glykogenäquivalente. Um die absolute Glykogenmenge zu errechnen, sind die angegebenen Werte mit 0,927 zu multiplizieren.

Versuchsergebnisse.

Der Glykogengehalt des Zwerchfells der einzelnen Ratten bzw. der Hälften des gleichen Tieres zeigt erhebliche Schwankungen. Die Mittelwerte aus nur wenigen Bestimmungen jedoch weisen eine weitgehende

Übereinstimmung aus (Tabelle 1, A, Tabelle 2, A, linke Rubrik). Die Glykogenmenge bei hungernden Tieren ist gleichmäßiger und scheint etwas geringer zu sein. Die Analysen aus den 12 sogleich nach dem Töten untersuchten Hälften gefütterter Tiere (Tabelle 1, A, rechte und linke Hälfte und Tabelle 2, A, rechte Hälfte), ergeben einen Mittelwert von 0,126%, der entsprechende Wert aus 8 Untersuchungen bei Hungertieren (Tabelle 1, B, rechte und linke Hälfte und Tabelle 2, B, linke Hälfte) ist 0,107%. Bei der geringen Zahl der Versuche und der großen individuellen Streuung sind diese Werte nicht signifikant. Sie stimmen jedoch gut mit denen von Wetzel, Wollschitt, Ruska und Oestreicher[28] überein, die im Quadrizeps von Ratten nach 2tägigem Hunger eine Glykogenabnahme von 4%, nach 4 Tagen eine solche von 13% feststellten. Auch diese Autoren finden die von uns beobachtete große Schwankungsbreite bei den einzelnen Tieren. Das Zwerchfell enthält nach unseren Ergebnissen weniger Glykogen als der Quadrizeps (0,53%) und zeigt damit eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Herzmuskel. Nach der Wiederauffütterung ist der Gehalt in den beiden Hälften ebenfalls gleichmäßiger mit einer entsprechenden Zunahme gegenüber den beiden anderen Versuchsserien (Tabelle 1, C und 2, C, linke Hälfte). Nach 2stündlichem Aufenthalt in der Suspensionsflüssigkeit zeigt sich die aus der Literatur bekannte Zunahme bei den gefütterten Tieren[23]. Sie betrug bei 4 Ratten im Durchschnitt 70% und war maximal 200%

Tabelle 1. *Glykogengehalt in der rechten und linken Zwerchfellhälfte von gefütterten (A), hungernden (B) und wiederaufgefütterten Ratten (C).*

	Versuchs-Nr.	Körpergewicht in Gramm bei Versuchsbeginn	Hungerzeit in Tagen	Körpergewicht im Hunger	Nach Wiederauffütterung	Gewicht der 1. Zwerchfellhälfte in mg	Gewicht der 2. Zwerchfellhälfte in mg	Glykogengehalt der 1. Zwerchfellhälfte in %	Glykogengehalt der 2. Zwerchfellhälfte in %
A	2	270				178	228	0,08	0,09
	3	272				294	258	0,15	0,30
	4	275				239	242	0,14	0,16
	4a	162				123	146	0,14	0,13
						Mittelwert		0,13	0,17
B	10	240	7*	210		120	171	0,07	0,08
	11	260	9*	220		145	136	0,13	0,15
						Mittelwert		0,10	0,11
C	21	262	3	230	250	235	125	0,21	0,20
	22	158	3	135	150	177	170	0,22	0,30
						Mittelwert		0,215	0,250

* Tier 10 und 11 erhielten in den letzten 3 Tagen täglich einmal soviel Futter, daß das Körpergewicht annähernd konstant blieb.

Tabelle 2. *Glykogengehalt der rechten und linken Zwerchfellhälfte.*
Die eine Hälfte wurde 2 Stunden in der Glukose-Suspensionsflüssigkeit belassen.

	Versuchs-Nr.	Körpergewicht in Gramm bei Versuchsbeginn	Hungerzeit in Tagen	Körpergewicht im Hunger	Nach Wiederauffütterung	Gewicht der 1. Zwerchfellhälfte in mg	Gewicht der 2. Zwerchfellhälfte in mg	Glykogengehalt der 1. Zwerchfellhälfte in %	Glykogengehalt der 2. Zwerchfellhälfte nach 2stündl. Aufenthalt in Glukose-Ringerlösung
A	5	250				229	187	0,30	0,40
	7	280				192	182	0,05	0,14
	8	230				195	185	0,07	0,21
	9	190				233	275	0,10	0,15
						Mittelwert		0,13	0,22
B	13*	260	10	220		142	221	0,08	0,032
	14*	220	11	177		120	181	0,11	0,08
	15*	230	10	187		184	203	0,13	0,13
						Mittelwert		0,11	0,08
C	17*	238	10	180	200	145	99	0,27	1,12
	18*	130	12	165	205	158	98	0,41	1,00
	19	196	14	162	180	145	86	0,51	1,10
	20	140	3	110	130	100	81	1,60	2,00
	22	158	3	135	150	110	116	0,10	1,10
						Mittelwert		0,58	1,22

* Tiere 12—18 erhielten in den letzten 4—6 Tagen täglich Futter ähnlich wie Tier 10 und 11 in Tabelle 1. Im übrigen siehe Tabelle 1.

Tabelle 3. *Glykogengehalt im rechten und linken Hodenfettgewebe unter verschiedenen Ernährungsbedingungen, im übrigen siehe Tabelle 1.*

	Versuchs-Nr.	Körpergewicht in Gramm bei Versuchsbeginn	Hungerzeit in Tagen	Körpergewicht im Hunger	Nach Wiederauffütterung	Gewicht des 1. Hodenfettgewebes in mg	Gewicht des 2. Hodenfettgewebes in mg	Glykogengehalt des 1. Hodenfettgewebes in %	Glykogengehalt des 2. Hodenfettgewebes in %
A	1	240				254	263	0,021	0,020
	2	270				254	192	0,019	0,027
	3	272				360	313	0,060	0,027
	4	275				364	282	0,020	0,060
	4a	162				263	238	0,032	0,038
						Mittelwert		0,030	0,034
B	10*	240	7	210		79	120	0,010	0,012
	11*	260	9	220		96	116	0,008	0,010
						Mittelwert		0,009	0,011
C	21	262	3	230	250	403	290	0,090	0,080
	22	158	3	135	150	363	265	0,080	0,070
						Mittelwert		0,085	0,075

bei dem Tier 8 (Tabelle 2, A). Bei den hungernden Ratten dagegen *fehlt* diese Neubildung. Die gefundenen Werte lassen sogar vermuten, daß trotz des großen Zuckerangebotes eine Glykogenolyse stattgefunden hat (Tabelle 2, B). Jedoch sind zur Bestätigung dieser Annahme noch weitere Untersuchungen erforderlich. Eine ganz erheb-

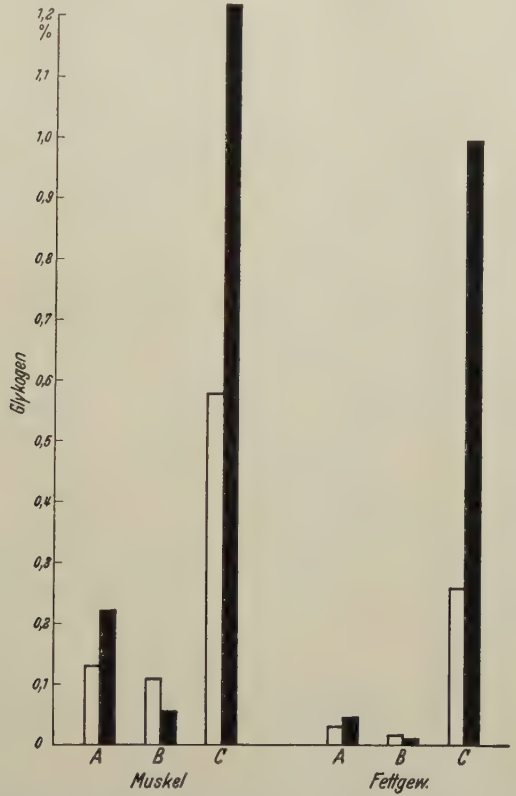


Abb. 1. ▭ Glykogengehalt der einen Zwerchfellhälfte und des einen Hodenfettkörpers von gefütterten (*A*), hungernden (*B*) und wiederaufgefütterten Ratten (*C*). ▬ desgleichen der anderen Zwerchfellhälfte bzw. des anderen Hodenfettgewebes nach 2stündlichem Belassen in Glukose-Ringerlösung. Mittelwerte aus den Tabellen 2 und 4.

liche Zunahme ist im Zwerchfell der wiederaufgefütterten Tiere in der Traubenzuckerlösung festzustellen. Sie beträgt im Durchschnitt über 100% (Tabelle 2, C).

Im Hodenfettgewebe gefütterter Tiere findet sich wesentlich weniger Glykogen als im Zwerchfell, es zeigt die auch aus anderen Untersuchungen bereits bekannte große Schwankungsbreite [27, 29]. Auch hier zeigen die Mittelwerte aus nur wenigen Analysen nur mehr geringe Unterschiede (Tabelle 3, A). Wesentlich gleichmäßiger ist der Gehalt

des rechten und linken Gewebes bei hungernden Tieren (Tabelle 3, B) oder bei wiederaufgefütterten. Diese zeigen die von verschiedenen Untersuchern beschriebene erhebliche Glykogenvermehrung[19] (Tabelle 3, C). In der Glukose-Ringerlösung nimmt der Glykogengehalt im Fettgewebe gefütterter Tiere durchschnittlich um 53% zu (Tabelle 4, A). Im Hunger dagegen ist wieder weniger Glykogen nachzuweisen, nur bei dem Tier 14 hat eine Zunahme stattgefunden. Die Glykogenolyse bei den übrigen Tieren ist relativ gering, so daß nicht mit Sicherheit zu sagen ist, ob sie signifikant ist (Tabelle 4, B). Eine ganz erhebliche Neubildung ist bei den gemästeten Tieren festzustellen, sie beträgt 284% (Tabelle 4, C).

In Abb. 1 sind die Ergebnisse aus den Tabellen 2 und 4 der besseren Übersicht halber graphisch dargestellt.

Tabelle 4. *Glykogengehalt im rechten und linken Hodenfettgewebe. Versuchsanordnung wie Tabelle 2.*

	Versuchs-Nr.	Körpergewicht in Gramm bei Versuchsbeginn	Hungerzeit in Tagen	Körpergewicht im Hunger	Nach Wiederauffütterung	Gewicht des 1. Hodenfettgewebes in mg	Gewicht des 2. Hodenfettgewebes in mg	Glykogengehalt des 1. Hodenfettgewebes in %	Glykogengehalt des 2. Hodenfettgewebes in %, nach 2stündlich. Aufenthalt in Glukose-Ringerlösung
A	5	250				202	354	0,01	0,02
	6	290				271	311	0,02	0,05
	7	280				274	341	0,03	0,05
	8	230				284	234	0,08	0,10
	9	190				260	261	0,006	0,01
						Mittelwert		0,030	0,046
B	12	240	8	200		79	160	0,010	0,007
	13	260	10	220		116	96	0,017	0,017
	14	220	11	177		60	64	0,005	0,008
	15	230	10	187		139	154	0,030	0,013
						Mittelwert		0,015	0,011
C	17	238	10	180	200	64	61	0,14	1,10
	18	180	12	165	200	195	140	0,194	1,12
	19	196	4	162	180	73	59	0,10	1,04
	20	140	3	110	130	90	110	0,75	1,10
	22	158	3	135	150	126	227	0,10	0,64
						Mittelwert		0,26	1,00

Besprechung der Ergebnisse.

Die Feststellung, daß die überlebende Muskulatur hungernder Ratten selbst bei einem großen Zuckerangebot nicht imstande ist Glykogen zu bilden, betätigen die Untersuchungsergebnisse von Dann und Chambers. Die Befunde von Himsworth bei fettreich ernährten

Menschen können nicht als Gegenbeweis angeführt werden. Die benutzten Personen erhielten relativ viel Eiweiß und dem Organismus stand damit eine exogene Zuckerquelle zur Verfügung. Wir haben unsere Versuchsbedingungen absichtlich extrem gewählt, um eine deutliche Abweichung von der Norm erkennen zu können. Insbesondere haben unsere Versuche gezeigt, daß nicht, wie Soskin annimmt, einzig eine geänderte Speicherfunktion der Hungerleber die Ursache der verminderten Zuckertoleranz ist. Ihre Fähigkeit zur Blutzuckerregulation infolge eines herabgesetzten Vermögens, Glukose zu retinieren und als Glykogen abzulagern, ist wahrscheinlich ebenso wie die der übrigen Gewebe gestört und die diabetische Zuckertoleranz im Hunger eine *allgemeine* Unfähigkeit der Gewebe, Kohlenhydrate in genügender Menge zu verwerten. Aus den Stoffwechseluntersuchungen von Dann und Chambers kann geschlossen werden, daß ebenso wie die Glykogenbildung auch die Oxydation des Zuckers herabgesetzt ist.

Wie bereits in der Einleitung besprochen, ist heute erwiesen, daß neben der Oxydation und Glykogenbildung ein wesentlicher Teil der Kohlenhydratverwertung in der Neubildung von Fett besteht. Im Hunger ist sowohl die Fähigkeit der Glykogenablagerung, als auch die der Fettsynthese erheblich eingeschränkt, vermutlich sogar zunächst aufgehoben. Aus den Untersuchungen von Henle und Szpingier[30], Eger[31] und Mirski[32] ist bekannt, daß isoliertes Fettgewebe gefütterter Tiere in Glukose-Ringerlösung fast immer einen respiratorischen Quotient weit über 1 zeigt. Die entscheidenden Untersuchungen mit Fettgewebe von Hungertieren, aus denen mit Sicherheit gesagt werden kann, ob die Fettsynthese im Hunger gestört ist, wurden bisher nicht ausgeführt. Da jedoch erwiesen ist, daß Glykogenablagerung und vermehrte Fettbildung in den Depots immer parallel gehen, darf angenommen werden, daß die Neubildung im Gewebe hungernder Tiere trotz des hohen Zuckerangebotes gestört ist, andererseits im Zustand der Kohlenhydratmast gesteigert. Durch diese Feststellungen verlieren die zahlreichen vergleichenden Untersuchungen an gesunden hungernden und diabetischen hungernden Tieren, aus denen geschlossen wurde, daß der diabetische Organismus Kohlenhydrate in gleicher Weise wie der normale verwerten kann, an der großen Beweiskraft, die ihr von den Anhängern der Überproduktionstheorie des Diabetes zugeschrieben werden. Auf diese Zusammenhänge hat Hausberger an anderer Stelle ausführlich hingewiesen[33]. Der hungernde Organismus gleicht weitgehend dem diabetischen, bei dem nach den Untersuchungen von Stetten und Boxer[34] mit Isotopen die hochgradige Verminderung der Glykogen- und Fettsynthese erwiesen ist. Wie schon erwähnt, kann die Störung im Kohlenhydratstoffwechsel im Hunger nicht durch Insulin behoben

werden, im Gegensatz zu der im Pankreasdiabetes. Der hungernde Organismus zeigt damit ein Verhalten, das nicht nur durch eine gehemmte Insulinsekretion zu erklären ist. Da eine ähnliche Insulinresistenz auch bei jenen Diabetesformen zu beobachten ist, die während der Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakten und Nebennierenrindensterinen auftreten, liegt es nahe, vor allem eine Überfunktion der Hypophyse im Hunger anzunehmen[35]. Diese Vermutung wird gestützt durch die Feststellung von Corkill und Delson[36], daß die Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakt 24 Stunden vor der Präparation den fördernden Einfluß des Insulins auf die Glykogenbildung im überlebenden isolierten Rattenzwerchfell fast völlig unterdrückt. Möglicherweise ist aber auch die Ansprechbarkeit der Gewebe im Hunger durch andere Einflüsse geändert.

Welche Einflüsse es schließlich sind, die die Fähigkeit der Gewebe so verändern, daß sie unter verschiedenen Bedingungen auf ein gleiches Angebot verschieden reagieren, wird weiter untersucht. Nach den bisherigen Kenntnissen über den Kohlenhydratstoffwechsel ist vor allem an ein verändertes Verhalten der innersekretorischen Drüsen zu denken.

Zusammenfassung.

Überlebendes Zwerchfell und Hodenfettgewebe von gefütterten, hungernden und mit kohlenhydratreicher Kost nach vorausgegangenem Hunger aufgefütterten Ratten zeigen in glukosehaltiger Suspensionsflüssigkeit folgende Veränderungen im Glykogengehalt:

1. Im Gewebe von gefütterten Tieren erfolgt eine Glykogenzunahme.

2. Diese fehlt bei Hungertieren.

3. Bei wiederaufgefütterten Ratten ist die Glykogenneubildung besonders stark.

Literatur.

[1] Hofmeister: Arch. exper. Path. (D.) **26**, 355 (1890). — [2] Claude, Bernard: Lesons sour le diabeté. Paris 1877. — [3] Adlersberg u. Porges: Klin. Wschr. **1926**, 32. — [4] Sweeney: Arch. int. Med. (Am.) **40**, 818 (1927). — [5] Bang: Der Blutzucker. Wiesbaden 1913. — [6] Himsworth: Clin. Sci. **2**, 67 (1933). — [7] Sweeney, Tunnell and Tunnell: Amer. J. clin. Path. **14**, 437 (1944). — [8] Vignard and Karr: J. biol. Chem. (Am.) **66**, 281 (1925). — [9] Philipp and Gilder: Endocrinology (Am.) **27**, 601 (1940). — [10] Soskin and Mirsky: Amer. J. Physiol. **114**, 106 (1935). — [11] Soskin and Levine: Carbohydrate Metabolism. Chicago 1946. — [12] Dann and Chambers: J. biol. Chem. (Am.) **89**, 675 (1930). — [13] Himsworth: Lancet **1939 II**, 1, 65, 118, 171. — [14] Bergmann and Drury: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **37**, 414 (1947). — [15] Drury: J. clin. Endocrinol. **2**, 421 (1942). — [16] Stetten and Boxer: J. biol. Chem. (Am.) **155**, 231 (1944). — [17a] Hausberger: Verh. Ges. Verdgskrkh. **1938**. — [17b] Hausberger: Z. exper. Med. **102**, 169 (1937). — [17c] Hausberger u. Neuenschwander-Lemmer: Arch.

exper. Path. (D.) **192**, 530 (1939). — [17d] Hausberger u. Neuenschwander-Lemmer: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 110 (1939). — [18] Literatur siehe [17c] und Eger: Klin. Wschr. **1938**, 1933. — [19] Scoz: Arch. Sci. biol. (It.) **17**, 262 (1932). — Ruska u. Quast: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 217 (1935). — Felix u. Eger: Arch. klin. Med. **182**, 623 (1938). — [20] Scoz, Baer e Boeri: Arch. Sci. biol. (It.) **22**, 142 (1936). — [21] Hausberger u. Guyot: Arch. exper. Path. (D.) **187**, 647 (1937). — [22] Scoz: Arch. Sci. biol. (It.) **18**, 385 (1933); **20** (1934). — [23] Gemmill and Hamman: Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **66**, 232 (1940). — Hechter, Levine and Soskin: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **46**, 390 (1941). — [24] Werthessen: Amer. J. Physiol. **120**, 458 (1937). — [25] Seckel: Endocrinology (Am.) **23**, 751 (1938). — [26] Good, Kramer and Somogyi: J. Biol. Chem. **100**, 485 (1933). — [27] Scoz: Arch. de Sci. biol. (It.) **17**, 236 (1932). — [28] Wetzel, Wollschitt, Ruska u. Oestreicher: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 703 (1936). — [29] Scoz: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **5**, 1 (1930). — [30] Henle u. Szpingier: Arch. exper. Path. **180**, 672 (1936). — [31] Eger: Verh. Ges. Verdgskrkh. **1938**. — [32] Mirski: Biochem. J. (Brit.) **36**, 232 (1942). — [33] Hausberger: (Im Druck). — [34] Stetten and Boxer: J. biol. Chem. (Am.) **156**, 271 (1944). — [35] Hausberger: Schweiz med. Wschr. **1949**, 267. — [36] Corkill and Nelson: Med. J. Australia **1**, 172 (1947).

Dr. Hausberger, 155 West, 71th Street, New York 23, N.Y.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 82—89 (1949).

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. med. F. A. Hoppe-Seyler †).

„Polypeptid-“ und Reststickstoff des Blutserums im experimentellen Verbrennungsschock.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Oktober 1948.)

Verbrennungen schweren Grades führen häufig zu Erscheinungen am Kreislauf, die denjenigen nach schweren Traumen weitgehend ähneln. Selten ist jedoch das Auftreten eines *primären* Schockzustandes sofort im Anschluß an die Verbrennung, während bei genügend starker thermischer Körperschädigung im Verlauf der nächsten Stunden wohl immer ein Zustand eintritt, der im Experiment dem *sekundären* traumatischen Schock und dem Volumenmangelkollaps weitgehend ähnelt.

Bei diesem Schockzustand kommt es zur Zentralisation des Blutes in lebenswichtigen Organen unter dem Einfluß des Sympathikus (vgl. Duesberg und Schroeder[1]). Falls der Tod eintritt, so erfolgt dieser unter allen Zeichen des Kreislaufzusammenbruchs. Von diesem Verbrennungsschock müssen streng getrennt werden Folgeerscheinungen, die zu einem späteren Zeitpunkt, meistens vom 4. Tag nach der Verbrennung an, eintreten und welche auf Infektionsfolgen oder sekundäre Auswirkungen schwerer Organschäden (z. B. an Nebennieren, Leber usw.) zurückgeführt werden müssen. Während des eigentlichen Verbrennungsschocks kommt eine hochgradige Abnahme der zirkulierenden Blutmenge, bedingt durch Plasmaaustritt in das durch die Verbrennung geschädigte Gewebe, mit erheblicher Zunahme des Hämoglobins und der Erythrozytenwerte des Blutes zur Beobachtung (Schwiegk[2]).

Immer wieder wurde versucht, toxische Substanzen, welche aus dem geschädigten Gewebe freigemacht werden und in die Blutbahn gelangen sollten, für den Eintritt des Verbrennungsschocks verantwortlich zu machen. Daß die Kapillarschädigung am Ort der Verbrennung wie auch in parenchymatösen Organen mit ihrer Permeabilitätsstörung wenigstens zum Teil auf Gewebszerfallgifte zurückgeführt werden kann, liegt auf der Hand. Kommt es doch unter dem Wärmeeinfluß nicht nur zur erheblichen Erhöhung des Gewebsstoffwechsels mit relativem Sauerstoffmangel, bei dem anoxybiotische Stoffwechselvorgänge durch Dekarboxylierung bestimmter Aminosäuren zur Bildung vasoaktiver Amine führen können, auch durch unmittelbare Einwirkung der Hitze auf die Gewebseiweiße kommt es nach Denaturierung zum Eiweißzerfall. Pfeiffer und Mitarb.[3] sprechen hier geradezu von einer Eiweißzerfallsvergiftung. Unter dem Gesichtspunkt, die Resorption derartiger, toxischer Eiweißabbauprodukte zu verhindern, wurde von Davidson[4] und Wilson[5] die Behandlung von Verbrennungen mit Gerbsäure eingeführt. Doch weist Aldrich[6] mit Recht darauf hin, daß die zweifellos guten Erfolge dieser Behandlungsmethode auf der Verhinderung des Flüssigkeitsverlustes aus der Blutbahn und der durch die Gerbung verminderten Reizung sensibler Nerven beruhen könnten.

Im Gefolge von erheblichen Verbrennungen kommt es zu Steigerungen des Reststickstoffes im Blut. Dieser von anderer Seite mehrfach beobachtete Befund konnte in den im folgenden beschriebenen Versuchen an Hunden bestätigt werden. Andererseits treten bereits kurze Zeit nach Verbrennungen ($^1/_2$ Stunde) große Mengen proteolytischer und peptolytischer Fermente im Blut auf (Pfeiffer[3]), während im Normalblut diese Fermente nicht in nachweisbarer Menge vorhanden sein sollen. Es liegt nahe, einen Zusammenhang zwischen beiden Beobachtungsreihen anzunehmen. Derartige Gedankengänge führen weiter zu der bereits vielfach erörterten Frage, ob diesen Veränderungen eine unmittelbare, ursächliche Bedeutung für das Zustandekommen von Schockzuständen oder einer Schockbereitschaft nach schweren Verbrennungen zukommt. Pfeiffer selbst stellte eine toxische Wirkung des Harns verbrühter Menschen und Tiere fest; nach subkutaner Injektion desselben beim Meerschweinchen erzeugte er Hautnekrosen. Lieb u. Schadendorff[7] nehmen an, dies sei bedingt durch das Auftreten toxisch wirkender Polypeptide im Harn als Folge des Eiweißzerfalls im geschädigten Gewebe entsprechend den Vorstellungen Pfeiffers von der Eiweißzerfallsvergiftung. Nach diesem soll übrigens die Menge dieser toxischen Stoffe im Blut zunächst gering sein, erst nach längerer Zeit und stärkerer Schädigung („Ermüdung“) der Nieren würde sich das Bild ändern: der Gehalt des Blutes an giftigen Substanzen soll zunehmen, der des Harns absinken. Der Harn würde dabei schließlich unter Umständen wieder nahezu giftfrei.

Nach all dem konnte erwartet werden, daß bei Schockzuständen im Anschluß an Verbrennungen eine Vermehrung der sog. Polypeptide im Blut nachweisbar sein müßte. Im Zusammenhang mit eigenen Versuchen über Aktivitätsänderungen der Serum-Cholinesterase im „Frühschock“ nach starker Verbrennung (8) von relativ kurzer Dauer ging ich deshalb der Frage nach, ob im Verbrennungsschock eine „Polypeptidämie“ beobachtet werden und ob gegebenenfalls diese von ursächlicher Bedeutung für das Zustandekommen des Verbrennungsschocks sein kann.

Die Angaben der mir zugänglichen Literatur über vermehrtes Auftreten von Polypeptiden im Blut nach Verbrennungen beschränken sich ausschließlich auf Fälle, in denen es spät, häufig erst am 2. oder 3. Tag nach der Verbrennung, zu derartigen Blutveränderungen kam. So fanden Lambret, Driessens und Warembourg[9] bei Versuchen an Hunden nach großen Verbrennungen 2. Grades eine Erhöhung des Polypeptid-Stickstoffes im Blut, jedoch trat diese Steigerung erst 18—24 Stunden nach der Schädigung auf. Die Tiere überlebten dabei, im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, die Verbrennung längere Zeit. Bei diesen Versuchen von Lambret, Driessens u. Warembourg kann der Einwand nicht ausgeschlossen werden, daß der erhöhte Polypeptidgehalt des Blutes sekundär durch Eiweißzersetzung bakterieller Art und Resorption der dabei entstandenen Spaltprodukte am Ort der lokalen Schädigung oder aber, und dies scheint mir wahrscheinlicher, auf sekundäre Leberschädigung innerhalb deren Funktion im Eiweißstoffwechsel zurückzuführen ist.

Methode der Polypeptid-Bestimmung.*

Bei der Bestimmung der Polypeptid-Fraktion des Serums ging ich nach der sog. „Zwei-Stickstoff-Bestimmungsmethode“ (Wolff[10]) vor. Die Blutproben

* Frau Dorothea Jonckheer-Schultz danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Polypeptid-Bestimmungen.

wurden sofort nach der Entnahme scharf zentrifugiert (4500 Umdr./Min., 60 Min.), um sicher zellfreies Serum zu gewinnen.

Von diesem Serum wurden folgende Filtrate hergestellt:

1. Wolframsäure-Filtrat *(Folin)*: 5 cm³ Serum + 35 cm³ Aqua redestillata + 5 cm³ Natriumwolframat 10%ig + 5 cm³ Schwefelsäure 2/3 n.

2. Trichloressigsäure-Filtrat: 5 cm³ Serum + 40 cm³ Aqua redestillata + 5 cm³ Trichloressigsäure 20%ig.

Beide Gemische wurden einige Minuten im Erlenmeyerkolben geschüttelt, dann mindestens 45 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen und sodann zentrifugiert. Stand die Mischung nur kürzere Zeit, so zeigte sich auch nach mehrmaliger Zentrifugation noch eine Opaleszenz der zentrifugierten Flüssigkeit (als „Filtrat" im folgenden bezeichnet), und es ergaben sich in diesen Proben zu hohe N-Werte gegenüber klaren Versuchslösungen. Von dem jeweiligen klaren „Filtrat" wurden 10 cm³ in der üblichen Weise nach feuchter Veraschung mittels konzentrierter H_2SO_4 zur NH_3-Bestimmung durch Destillation im Mikrokjeldahl-Apparat nach Parnas-Wagner benutzt.

Trichloressigsäure-Filtrat-N minus Wolframsäure-Filtrat-N = Polypeptid-N im Serum.

Obwohl eine ganze Reihe von Untersuchungen über die Methodik der Polypeptid-Stickstoff-Bestimmung durchgeführt wurden (u. a. Hiller u. van Slyke[11], Cristol u. Mitarb.[12], Richter u. Wachtfajdl[13], Larizza[14]), ist nicht eindeutig geklärt, welche Substanzen eigentlich mit der Differenz zwischen Trichloressigsäure-Filtrat-N und Wolframsäure-Filtrat-N erfaßt werden; jedoch ist anzunehmen, daß, falls Stoffe vom Polypeptidcharakter im Blut auftreten, diese zum größten Teil in ihrer Menge mit dieser Methode bestimmt werden. Da es mir nur darauf ankam, Veränderungen des Gehaltes an polypeptidartigen Eiweißspaltprodukten im Serum nachzuprüfen und nicht Absolutwerte definierter Substanzen festzustellen, hielt ich entsprechend den von anderen Untersuchern durchgeführten Arbeiten die „Zwei-Stickstoff-Methode" mit den beiden benutzten Säuren bei kritischer und sorgfältiger, gleichmäßiger Ausführung für meine Untersuchungen für ausreichend.

Tierversuche.

Die Verbrennungsversuche wurden durchgeführt an insgesamt 7 Hunden im Gewicht von 13—21 kg unter Pernocton- bzw. Pernocton-Chloralose-Narkose. Zu Blutentnahmen, Injektionen und Blutdruckmessung wurden A. brachialis sin., V. brach. sin. oder dextra und A. carotis dextra freigelegt und in ihre zentralen Stümpfe Metallkanülen eingebunden. Der Blutdruck wurde mittels Quecksilbermanometer blutig an der Carotis gemessen, die Blutdruckkurven aufgezeichnet.

An 2 weiteren Hunden wurden Leerversuche durchgeführt, d. h. hier wurden, abgesehen von der eigentlichen Verbrennung, die gleichen Maßnahmen vorgenommen wie bei den übrigen Versuchstieren. Die Abb. 1—3 zeigen die Ergebnisse dieser Polypeptid- und Rest-N-Bestimmungen.

Praktisch halten sich die Stickstoffwerte in diesen Versuchen sowohl im Wolframsäure-Filtrat als auch im Trichloressigsäure-Filtrat mit leichten Schwankungen auf gleicher Höhe. Der Polypeptid-Stickstoff, d. h. die Differenz der beiden Bestimmungswerte, zeigt nur einen geringfügigen Anstieg, welcher jedoch innerhalb der Streubreite der Methode liegt.

Bei den Verbrennungsversuchen selbst entnahm ich nach Narkose und den vorbereitenden operativen Eingriffen (Freilegung von Gefäßen, Einbinden der Metallkanülen usw.) und vor Beginn der Verbrennung mindestens eine Blutprobe zur Feststellung des Normalwertes (= Ausgangswertes) der Stickstoff-Fraktionen.

Diese Entnahme erfolgte wie in den Vorversuchen frühestens 45 Min. nach der letzten Injektion von Pernocton oder Chloralose, so daß etwaige Einflüsse eines Narkotikums auf die Höhe der Stickstoffwerte dieser Proben ausgeschlossen sein dürften. Weitere Leerwerte vor Beginn des eigentlichen Verbrennungsversuches zu entnehmen, schien mir nicht erforderlich, da bereits aus der Literatur bekannt ist, daß die Stickstoffwerte des Trichloressigsäure- und Wolframsäure-Filtrats

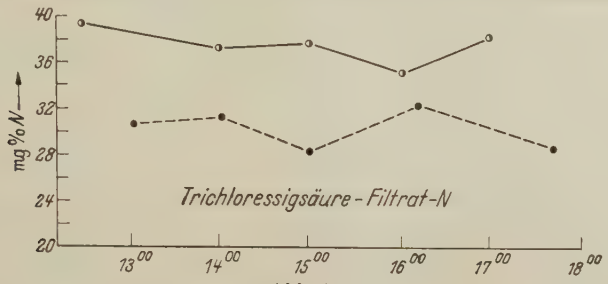


Abb. 1.

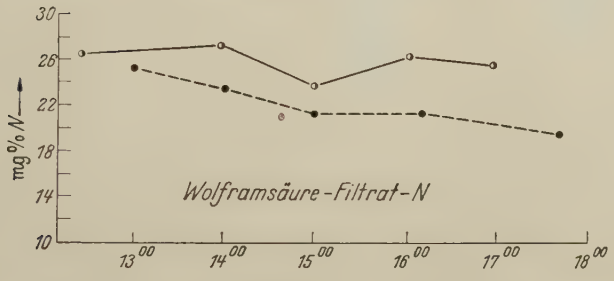


Abb. 2.

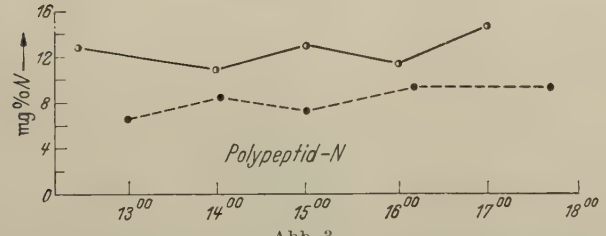


Abb. 3.

Abb. 1—3. Rest- und Polypeptid-Stickstoff im Leerversuch am Hund.
● — — — ● Hund Nr. 62 (16,5 kg); o——o Hund Nr. 68 (21,0 kg).

eine bemerkenswerte Konstanz in ihrer Höhe zeigen, sofern innerhalb der Versuchsdauer keine Nahrungsaufnahme erfolgt. Dieser Befund wird durch die eigenen Vorversuche bestätigt. Die einzelnen Blutproben ließ ich bei allen Entnahmen unter eigenem Druck aus der A. brachialis in ein Zentrifugenglas einfließen. Die ersten Kubikzentimeter wurden verworfen, um Stauungseinflüsse auf die Stickstoffwerte des Serums auszuschließen. 30—60 Min. nach dieser Blutentnahme wurden an beiden Hinterbeinen Verbrennungen gesetzt. An der einen Extremität durch Bestrahlen mit einer Heizsonne (500 Watt) aus einer Entfernung von etwa 25 cm, an dem anderen Hinterbein durch zwei Glühlampen (je 150 Watt) aus einer Entfernung von etwa 10 cm. Dauer der Hitzeeinwirkung bei 6 Hunden 25—60 Min. Bei einem Hund (Nr. 52) wurde die Schädigung bis

zum Tod fortgesetzt. Die weiteren Blutentnahmen wurden in diesem einen Versuch während der Verbrennung entnommen. Bei den übrigen 6 Hunden wurde innerhalb der ersten 10 Min. nach Absetzen der Verbrennung die zweite Blutprobe zur Filtratgewinnung und Stickstoffauswertung entnommen. Während des Blutdruckabfalls nach der Schädigung wurden sodann weitere Blutentnahmen durchgeführt. Die Größe der jeweils entnommenen Blutmenge betrug 50—90 cm³. Diese Blutproben wurden sofort nach der Entnahme zentrifugiert, um sicher zellfreies Serum zu gewinnen. Alle Seren wurden am Versuchstag selbst soweit verarbeitet, daß die einzelnen Proben im Veraschungskölbchen mit konz. H_2SO_4 versetzt waren. Die Veraschung und die weitere Auswertung erfolgte innerhalb der dem Versuchstag folgenden 4 Tage.

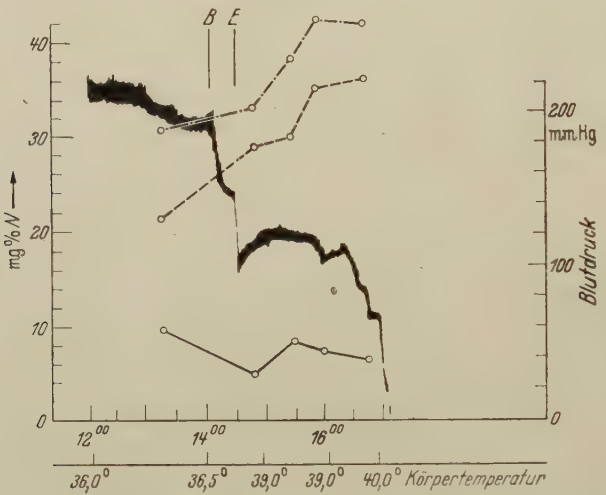


Abb. 4. Hund Nr. 54. Blutdruck, Polypeptid- und Reststickstoff im Verbrennungsschock. o——o Polypeptid-N; o— — —o Wolframsäure-Filtrat-N; o—·—·—o Trichloressigsäure-Filtrat-N. Die Marken geben Beginn (*B*) und Ende (*E*) der Beheizung an.

Als Beispiel eines Verbrennungsversuches sei das Protokoll eines Versuchs gebracht:

Nr. 54, 20. 6. 44, Schäferhündin, 21,0 kg.

Narkose: 0,62 cm³/kg Pernocton subkutan, 0,012 g/kg Chloralose intravenös. Für Injektionen und Blutentnahmen Metallkanüle in dem freigelegten Stumpf der V. brachialis sin. Blutdruckmessung an der A. carotis dextra.

Verbrennung durch Beheizung des linken Hinterbeines mittels Heizsonne (500 Watt) aus einer Entfernung von etwa 25 cm und des rechten Hinterbeins mittels zweier Glühlampen (je 150 Watt) aus einer Entfernung von etwa 10 cm. Dauer der Beheizung 30 Min. Verbrennungsfolgen: Verbrennung 1. und 2. Grades, Ödem beider Hinterextremitäten.

Blutentnahmen zu je 80 cm³ zur Filtratherstellung und Stickstoffauswertung.

Abb. 4 zeigt Blutdruck, Körpertemperatur, Rest- und Differenzstickstoff im Verlauf dieses Versuchs.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse der 7 Verbrennungsversuche bringen Abb. 5—7.

Dabei zeigt sich sowohl im Trichloressigsäure- wie im Wolframsäure-Filtrat erwartungsgemäß ein Anstieg der Werte nach der Verbrennung.

Dagegen fehlt bei den Differenzwerten, d.h. dem Polypeptid-Stickstoff der Anstieg gänzlich. Fast in allen Versuchen zeigt sich sogar in der

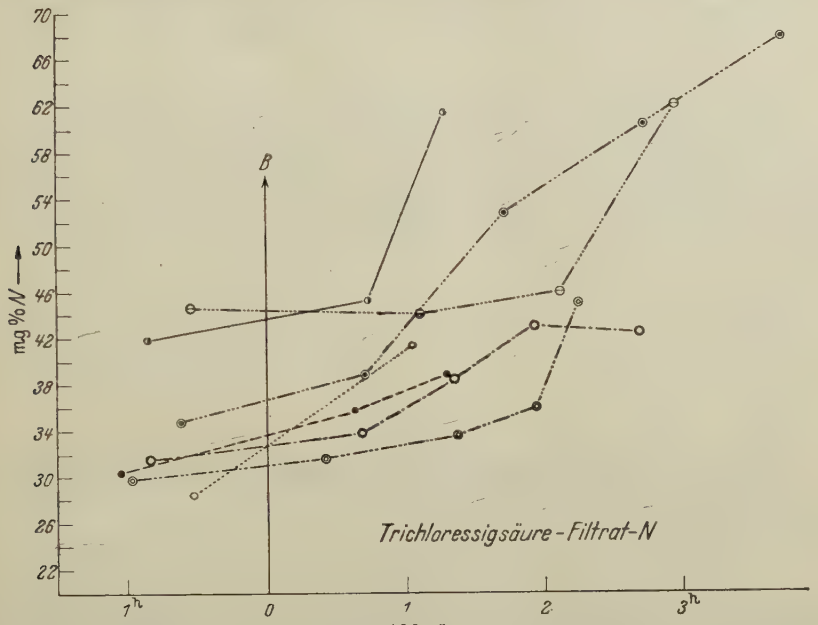


Abb. 5.

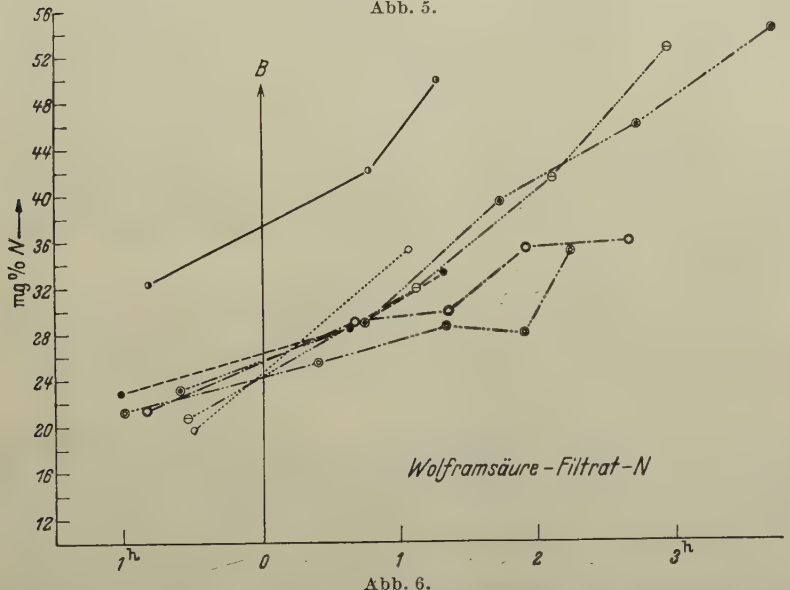


Abb. 6.

ersten Blutprobe nach Beginn der Verbrennung eine Senkung dieser Werte, die allerdings nur in einem Versuch außerhalb der Streubreite

liegt. In diesem Versuch (Hund Nr. 59) bleiben auch die später gewonnenen Werte wesentlich unterhalb des Ausgangswertes, während in den restlichen 5 Versuchen, bei welchen weitere Bestimmungen ausgeführt werden konnten, die gefundenen Polypeptidwerte innerhalb der Streubreite bleiben.

Die Erhöhung der Stickstoffwerte in den Filtraten beider Säuren kann demnach nicht darauf zurückgeführt werden, daß höhermolekulare Eiweißspaltprodukte im Blut vermehrt auftreten, sondern muß hervorgerufen sein durch niedermolekulare Substanzen, die bei beiden Fällungen im Filtrat bleiben. In der Literatur finden sich

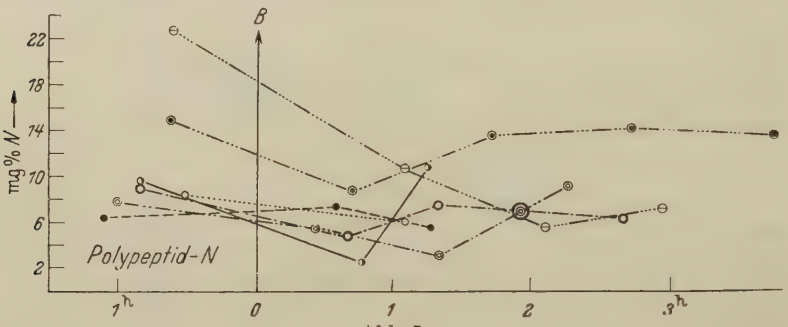


Abb. 7.

Abb. 5—7. Zeichenerklärung: *B* Beginn der Verbrennung. ——— Hund Nr. 52 (13,0 kg, Hitzeeinwirkung bis zum Tod); — — — Hund Nr. 53 (15,3 kg, Hitzeeinwirkung 30 Min.); —·—·— Hund Nr. 54 (21,0 kg, Hitzeeinwirkung 30 Min.); —··—·· Hund Nr. 56 (15,7 kg, Hitzeeinwirkung 25 Min.); —····— Hund Nr. 58 (17,5 kg, Hitzeeinwirkung 40 Min.); —·····— Hund Nr. 59 (17,5 kg, Hitzeeinwirkung 60 Min.); ..... Hund Nr. 64 (13,5 kg, Hitzeeinwirkung 60 Min.).

bereits Angaben darüber, daß ein Anstieg der Harnstoffwerte (Lowdon, Ross, McKail, Rae, Stewart u. Wilson[15]), der Harnsäure (Lambret, Driessens u. Warembourg[9]) und des Kreatins (Stolfi[16]) beobachtet wurden. Die NH_3-Werte sollen keinen Anstieg erfahren (Lambret, Driessens u. Warembourg).

Da in den untersuchten Fällen von experimentellem Verbrennungsschock der Polypeptidgehalt des Blutserums nicht erhöht ist, kann dieser nicht unmittelbar für die Entstehung des beobachteten Schocks verantwortlich gemacht werden.

Auch kann das Auftreten peptolytischer und proteolytischer Fermente zumindest in dem Sinne als schockauslösender Faktor ausgeschlossen werden, daß diese Enzyme über eine Spaltung der Bluteiweißkörper pathogenetisch eine Rolle spielen würden, da auch in diesem Fall höhermolekulare, mit der benutzten Methode erfaßbare Eiweißspaltprodukte im Serum auftreten müßten. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß am Ort der Verbrennung nicht doch auch schon zu diesem Zeitpunkt die Bildung polypeptidartiger Eiweißabbauprodukte erfolgen kann. Auch ist es durchaus möglich, daß diese in die Blutbahn übertreten können. Die eigenen Versuche lassen zwar einen Anstieg dieser Fraktion vermissen, falls

jedoch das Eintreten dieser Stoffe in die Blutbahn durch Ausscheidung oder weiteren Abbau zu niedermolekularen Substanzen in anderen Organen (Leber, Niere) völlig kompensiert würde, wäre die Resorption solcher, unter Umständen toxisch wirkender Stoffe mit der angewandten Methode nicht auszuschließen.

Zusammenfassung.

Mit der „Zwei-Stickstoff-Methode“ wird der Gehalt des Blutserums von Hunden an Polypeptid-Stickstoff (Differenz-N) nach experimentellen örtlichen Verbrennungen untersucht. Der Normalgehalt des Hundeserums beträgt in den eigenen Versuchen 6—15 mg-% Polypeptid-N bei einem Reststickstoff von 28—39 mg-% (Trichloressigsäure-Filtrat) bzw. 20—27 mg-% (Wolframsäure-Filtrat). Nach schweren, schockauslösenden Verbrennungen wurde zwar ein erheblicher Anstieg des Reststickstoffs gefunden, doch fehlten Steigerungen des sog. Polypeptid-Stickstoffs.

Literatur.

[1] Duesberg, R., u. W. Schroeder: Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände. Leipzig: S. Hirzel 1944. — [2] Schwiegk, H.: Klin. Wschr. **1942** I, 741, 765. — [3] Pfeiffer, H.: Krankheitsforsch. **1**, 407 (1925). — Standenath, F.: Fermentforsch. **9**, 10, 42 (1926). — [4] Davidson, E. C.: Surg. etc. **41**, 202 (1925). [5] Wilson, W. C.: Med. Res. Comm. Spec. Rep. No 141. London 1929. — [6] Aldrich, R. H.: New Engld J. Med. **208**, 299 (1933). — [7] Lieb, H., u. E. Schadendorff: Arch. exper. Path. (D.) **172**, 343 (1933). — [8] Schümmelfeder, N.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 567, 626 (1947). — [9] Lambret, O., J. Driessen et H. Warembourg: C. r. Soc. Biol. **123**, 10 (1936). — [10] Wolff, E.: Om forekomsten av albumosliknande substansea i blodet. Diss. Lund 1920. — [11] Hiller and van Slyke: J. biol. Chem. (Am.) **53**, 253 (1922). — [12] Cristol, P., et A. Puech: Bull. Soc. Sci. méd. et biol. Montpellier etc. **7**, 48 (1925). — [13] Richter, A. F., u. V. Wachtfajdl: Časopis česk. Lék. **18**, 179 (1939). — [14] Larizza, P.: Erg. inn. Med. **59**, 59 (1940). — [15] Lowdon, A., G. Ross, R. A. McKail, S. L. Rae, C. P. Stewart and W. C. Wilson: J. Physiol. (Brit.) **96**, 27 P (1939). — [16] Stolfi G.: Arch. Sci. biol. (It.) **22**, 583 (1936). — Boll. Soc. ital. Biol. sper. **15**, 457 (1940)

Dr. N. Schümmelfeder, (21a) Münster i. Westf. Westring 17,
Pathologisches Institut der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 90—98 (1949).

Aus der Hautklinik der Westfälischen Landes-Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. med. C. Moncorps).

Über den Einfluß von Penicillin auf den Arbeitsrhythmus des Mäusepankreas*.

Von

Wilhelm Blaich.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Oktober 1948.)

Bei der geschlechtsreifen weißen Maus bewirkt Penicillin Änderungen des Östrus (Blaich) und setzt bei infantilen Mäusen Veränderungen an den Ovarien in Gestalt von erweiterten und strotzend mit Blut gefüllten Gefäßen, sowie bisweilen in Form einer Stimulierung des Größenwachstums der Follikel (Blaich).

Zunächst wurde an eine hormonale Wirkung von Penicillin gedacht. Tierversuche mit kastrierten geschlechtsreifen Mäusen und die Befunde der Ovarien von infantilen Tieren erwiesen jedoch, daß eine hormonartige Wirkung oder die Beimengung von gonadotropem Hormon als Ballaststoff der Penicillinhandelspräparate nicht in Frage kommt. Unsere Beobachtungen ließen aber vermuten, daß Penicillin in das Gleichgewicht des autonomen Nervensystems eingreift und hier vielleicht einen erhöhten Vagotonus hervorbringt (siehe Emanuel, Guggisberg, Kraul, Hirsch-Hoffmann). In diesem Sinne schien nicht nur eine Hyperämie der sichtbaren Genitalschleimhaut einzelner Mäuse, sondern auch die gleiche Erscheinung bei einigen nur mit Penicillin behandelten Kleinkindern zu sprechen. Schließlich sind in diesem Zusammenhang exsudative Prozesse am Augenhintergrund und Veränderungen an den Hautkapillaren des Menschen während länger dauernder Penicillinbehandlung zu erwähnen (Blaich, Blaich und Ehring).

Die vorliegende Mitteilung betrifft Versuche, deren Ziel es war, die vermutete Wirkung des Penicillins auf das vegetative Nervensystem eindeutiger durch die Analyse des Penicillineffektes auf die exkretorischen Zellen des Mäusepankreas zu erfassen. Die von G. Chr. Hirsch ausgearbeitete und von Ries in besonderem Umfange verwendete Methode bietet die Möglichkeit, Funktion und morphologische Veränderungen der Drüsenacini (in Äthernarkose) während des ganzen,

* Es ist mir eine angenehme Pflicht, bei dieser Gelegenheit Frau Prof. Dr. Ilse Fischer, Universität Münster, für ihre Hilfe und Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen zu danken.

etwa 14 Stunden dauernden Arbeitsrhythmus des Pankreas zu beobachten.

Methodische Vorbemerkungen. Der Arbeitsrhythmus der exokrinen Drüsenzellen des Mäusepankreas verläuft nach dem physiologischen Fütterungsreiz in verschiedenen Acini asynchron bis chaotisch. Durch Verwendung eines kräftigen vagotropen Reizes lassen sich experimentell alle Drüsenazini zur gleichen Zeit zur Sekretausschüttung zwingen. Der Arbeitsrhythmus wird dadurch synchron. Am deutlichsten treten diese Vorgänge beim Hungertier in Erscheinung, bei welchem alle den Drüsenlumina zugewandten Zellenanteile prall mit Proenzymgranula gefüllt sind.

Im Stapelpankreas (Abb. 1) fließen etwa 30 Min. nach der intravenösen Pilokarpininjektion die Proenzymgranula zu Vakuolen zusammen, die in das Sekretlumen ausgeschüttet werden. Unmittelbar nach diesem Extrusionsvorgang beginnt die Restitution von neuem Sekret, welche mit einer ersten Phase der Lipochondrienzerschnürung beginnt. Die Lipochondrientochtergranula werden allmählich und im Laufe von Stunden zu Proenzymgranula umgewandelt. Etwa 6—7 Stunden nach Pilokarpin setzt die zweite Lipochondrienzerschnürungsphase ein. Unter Zuhilfenahme von Vitalfärbungen während oder nach der Lebendbeobachtung können auch die seit den Untersuchungen von Ries bekannten charakteristischen Veränderungen der Mitochondrien und die Farbstoffausflokkungen im Bereich der Golgisubstanz dargestellt werden. Deutlich erkennbar sind die beiden letzteren auch in stufenweise osmierten histologischen Schnitten (Einzelheiten s. Ries.)

Alle 17 Mäuse der eigenen Tierreihe wurden nach der Methode von Covell, Hirsch, Ries einer mehrstündigen Lebendbeobachtung unterzogen. Nach dem Versuch wurde das Pankreas teilweise ausgeschnitten und mit Toluidinblau vital gefärbt oder nach Fixation stufenweise osmiert. Die Befunde der Lebendbeobachtung wurden hierdurch ergänzt bzw. bestätigt.

Penicillin wurde anfänglich intravenös, später nurmehr subkutan injiziert. Die Dosis betrug 250 OE Penicillin in 0,1 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung. Bei den Mäusen, die gegenüber den Pilokarpinkontrollen verzögert eintretende Sekretausschüttung aufwiesen, wurde nach einiger Zeit eine zweite Injektion von 2—400 OE Penicillin gegeben. Zur Anwendung gelangte Na-Penicillin, Glaxo-Laboratories, Greenford. Der Gang der Beobachtung soll an einem Beispiel erläutert werden.

Pr.-Nr. 242. 26 g schwere Maus. Ausgehend vom Augenblick der subkutanen Penicillininjektion zeigt sich (s. Abb. 1—3):

Nach 5 Min. Typisches Stapelpankreas mit massenhaft apikal eingelagerten Zymogen- oder Proenzymgranula. Nur wenige Drüsenacini weichen durch mäßige Füllung von den übrigen ab. Drüsenzellen dunkel, nicht durchscheinend (Abb.1).

Nach 10 Min. Plötzliche Ausbildung großer Mengen von Extrusionsvakuolen bei reichlichem Zusammenfließen der Granula. Drüsenlumina unregelmäßig, erweitert.

Nach 15 Min. Extreme Menge von Extrusionsvakuolen, starke Erweiterung der Drüsenlumina. Die Zymogengranula sind völlig verschwunden. Die Drüsenzellen erscheinen hell und durchsichtig. Die Lipochondrien schwellen an, ihre Zerschnürung setzt ein (Abb. 2).

Nach 30 Min. Keine Extrusionsvakuolen mehr vorhanden. Die Lipochondrienzerschnürung hat deutlich zugenommen. (Abb. 3).

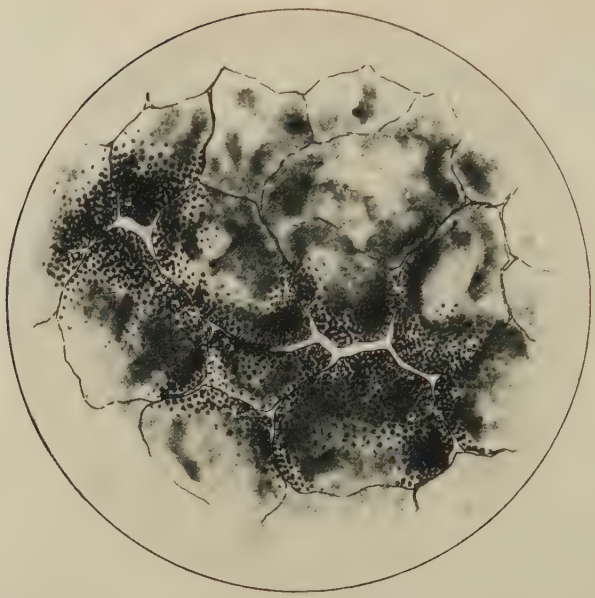


Abb. 1. Stapelpankreas des Hungertieres. Apikale Zellanteile dicht mit Zymogengranula angefüllt. Die Drüsenzellen erscheinen auch außerhalb dieser Zonen undurchscheinend. Drüsenlumen eng. Lipochondrien nicht sicher erkennbar. (Nach der Lebendbeobachtung bei einem Tier mit dem Zeichenapparat angefertigt. Pr.-Nr. 242, Gewicht 26,0 g. Leicht schematisiert. Zellbereiche besonders hervorgehoben.)

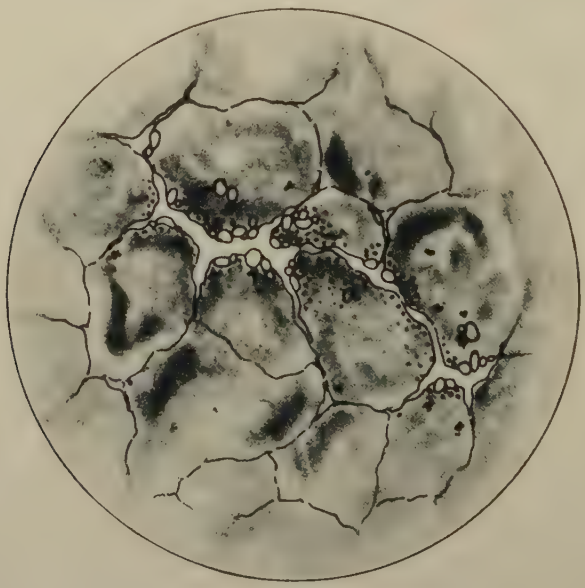


Abb. 2. 20 Min. nach subkutaner Penicillininjektion. Höhepunkt der Extrusion bereits abgelaufen. Der größte Teil der Zymogengranula ist extruiert, vereinzelt noch Extrusionsvakuolen. Drüsenzellen mehr durchscheinend als in Abb. 1. Lipochondrien werden sichtbar. Pr.-Nr. 242.

Nach 60 Min. Die Lipochondrienabkömmlinge wandern apikalwärts; in Kernnähe der einzelnen Zellen befinden sich die Lipochondrien immer noch in Vermehrung.

Nach 90 Min. Die ersten frisch gebildeten Zymogengranula tauchen im Zellapex auf. Immer noch deutliche Lipochondrienvermehrung, aber keine Zerschnürungsformen mehr sichtbar.

Nach 3 Stunden. Die Zymogengranula finden sich in großer Menge in den den Drüsenlumina zugekehrten Partien der Zelle eingelagert. Die Lipochondrienvermehrung hat abgenommen.

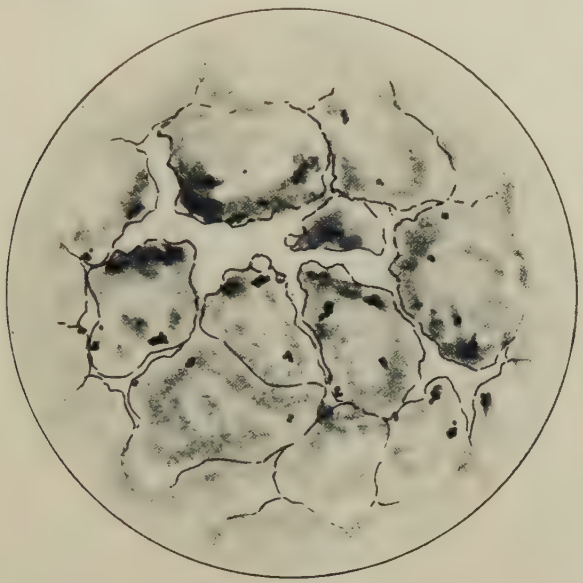


Abb. 3. 30 Min. nach Penicillin. Alle Zymogengranula sind in das stark erweiterte Sekretlumen ausgeschüttet. An der jetzt einsetzenden Lipochondrienzerschnürung und Ausbildung von Tochtergranula ist die beginnende Sekretrestitution kenntlich. Grundplasma der Drüsenzellen hell und durchscheinend. Pr.-Nr.242.

Nach 5 Stunden. Die Lipochondrien beginnen sich wieder zu vermehren und gleichzeitig werden die Drüsenzellen dunkler und weniger durchsichtig. Die zweite Phase der Restitution von Zymogengranula hat eingesetzt.

Nach 6 Stunden. Die Zymogenrestitution geht weiter. Das Basalplasma wird dunkler und immer weniger durchsichtig. Das Pankreas befindet sich deutlich erkennbar in der zweiten Phase des Arbeitsrhythmus.

Der ungehemmte Blutkreislauf, der überall leicht zu überblicken ist läßt annehmen, daß das Tier durch die lange Narkose nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Der Versuch wird abgebrochen, das Pankreas ausgeschnitten und zur histologischen Untersuchung vorbereitet.

Histologischer Befund. Bei ausgeprägt basophilen Ergastoplasma findet man fast alle Acini gestapelt mit fertigen Zymogengranula. In der Nähe des Kernes liegen zwischen den Granula noch vereinzelt feinste Ausläufer und Reste der netzförmigen Golgistruktur. Die Osmierung bringt ferner kleinste Lipochondrienabkömmlinge zur Darstellung. Auch die Mitochondrien sind als fadige Elemente kenntlich.

In der Zusammenfassung der Serienschnitte aus 3 Osmierungsstufen ergibt sich, daß sich fast alle Acini im gleichen Stadium des Arbeitsrhythmus befinden und daß das ganze Organ ein fast fertiges Stapelpankreas darstellt.

Die von Ries ermittelten Daten über den Ablauf des Arbeitsrhythmus des Mäusepankreas nach Pilokarpin und über das Tempo der sich ablösenden einzelnen Phasen bieten die Möglichkeit, Penicillin und Pilokarpin hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Pankreas zu vergleichen.

14 von den 17 untersuchten Mäusen reagierten *auf parenterale Zufuhr von Penicillin* mit einer *Sekretausschüttung* aus den Drüsenacini. Einige Tiere zeigten im Vergleich zur Pilokarpinwirkung einen verlangsamten Rhythmus, der sich manchmal durch eine erneute Penicillininjektion anscheinend beschleunigen und dem Pilokarpinrhythmus angleichen ließ. Hier fand sich gleichzeitig eine hemisynchrone bis asynchrone Arbeitsweise der einzelnen Acini. Eine weitere Anzahl von Tieren wies hinsichtlich des Arbeitstempos gegenüber Pilokarpin keine Unterschiede auf.

Bei 3 Mäusen kam es nicht zur Sekretausschüttung; die exkretorischen Drüsenzellen blieben unbeeinflußt. Dies könnte unter Umständen mit irgendwelchen, durch die Versuchstechnik hervorgerufenen Störungen zusammenhängen. Weiter unten werden einige der dabei in Frage kommende Faktoren besprochen.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen soll jedoch nicht auf das Studium des Tempos des Arbeitsrhythmus gelegt werden. Vielleicht wird die Pankreaszelle die Restitution von neuem Zymogenmaterial nach erfolgter Ausschüttung jeweils in dem gleichen, vielleicht in engen Grenzen schwankenden Zeitraum durchführen, wenn sie nicht durch zusätzliche Einwirkungen daran gehindert wird. Denn diese mit der Sekretausschüttung beginnenden Vorgänge unterliegen möglicherweise dem „Alles- oder Nichts-Gesetz". Wichtiger erscheint daher die *Feststellung, daß Penicillin* im großen ganzen *die Pankreasacini überhaupt zu einer Extrusion des Sekretes zwingt.*

Die *Art der Zusammenarbeit* der einzelnen Drüsenacini könnte als Maßstab für die *Reizstärke* dienen. Pilokarpin zwingt fast alle Acini zu einer synchronen Sekretausschüttung; doch finden sich nach Ries und nach den eigenen Versuchen immer wieder Tiere, deren Pankreas hinsichtlich der einzelnen Acini hemisynchron arbeitet. Nach unseren Untersuchungen scheint Penicillin ohne Rücksicht auf die Applikationsweise, ob intravenös oder subkutan, bei einer Anzahl von Mäusen nur einen Teil der Acini, bei der Mehrzahl jedoch fast alle oder sämtliche exkretorischen Drüsenanteile in einem synchronen Arbeitsrhythmus zusammenzufassen.

Durch statistische Analyse läßt sich gegebenenfalls eine Beziehung zwischen der Dosis des reizauslösenden Stoffes und der Anzahl der reagierenden Zellen finden.

Auch von der gelieferten Sekretmenge kann nicht direkt auf die Intensität des Reizes geschlossen werden. Bei der Dauerreizung durch Sekretin-Infusionen (Maltesos und Weigmann) steigt die Sekretion proportional der Durchblutung an.

Dabei spielt aber wahrscheinlich nicht nur die Höhe und Dauer der Sekretinzufuhr, sondern auch die Versorgung der Zellen mit Reizstoffen (ständige Anreicherung von Pentosenukleotiden im Ergastoplasma) eine Rolle.

Wenn bei elektrischer Reizung des N. vagus Sekretmenge und der Gehalt an organischen Substanzen mit steigender Reizintensität zunehmen, so kann das damit zusammenhängen, daß bei zunehmender Stärke des Reizes mehr Nervenfasern eines Nerven reagieren, welche mitunter auf verschiedene Reizstärken verschieden ansprechen, oder daß die Erregung der einzelnen Fasern mit steigender Frequenz der einzelnen Wellenfolgen abläuft.

Bei 2 Mäusen haben wir eine *Beschleunigung des Blutkreislaufes* in den Pankreasgefäßen im unmittelbaren Anschluß an eine zweite und während der Lebendbeobachtung durchgeführte Penicillininjektion gesehen. Obzwar wir alle fremden Einflüsse ausgeschlossen zu haben glaubten, muß dem Gedanken, diesen Befund in direkten Zusammenhang mit dem Penicillin zu bringen, mit Vorsicht begegnet werden.

Nicht geringe Bedenken müßten auch gegen die Absicht bestehen, die Ursache des hier gleichzeitig einsetzenden rascheren Arbeitstempos lediglich im Penicillin zu sehen. Die außerordentliche Empfindlichkeit des Pankreas gegenüber Schwankungen in der Blutversorgung ist bekannt (Babkin). So wirkt Blutansammlung in den Baucheingeweiden begünstigend auf die Sekretion des Pankreas; durch Abklemmung der arteriellen Gefäße kann die Sekretion gehemmt oder zum Stillstand gebracht werden. Einer Mehrabsonderung des Pankreassaftes geht eine Mehrdurchblutung parallel (Maltesos und Watson, Buston-Opitz). Diese engen Beziehungen zwischen der Funktion der Pankreaszellen und der Blutversorgung gestatten es nicht, eine bei der Lebendbeobachtung angetroffene Verlangsamung des Arbeitsrhythmus ohne weiteres dem Penicillin zur Last zu legen.

Im Zusammenhang mit der von der Blutversorgung so weitgehend abhängigen Arbeitsleistung des Pankreas sind noch weitere, bei der Methode der Lebendbeobachtung sich zum Nachteil auswirkende Faktoren zu berücksichtigen und zu vermeiden. Austrocknungserscheinungen, wenn die Operationswunde, die Milz und der freiliegende Pankreasanteil nicht häufig genug mit körperwarmer Ringerlösung benetzt werden, Spontanbewegungen des Tieres und dadurch eintretender Zug am Mesenterium (s. auch Kalbfleisch) können die Absonderung des Pankreassaftes wesentlich stören. Aus ähnlichen Erwägungen darf für die Narkose auch immer nur frischer Narkoseäther in möglichst geringer Menge verwendet werden.

Um sich über den *Wirkungsmechanismus des Penicillins auf die exokrinen Pankreaszellen* Klarheit zu verschaffen, sind die Bedingungen, unter welchen die Absonderung des Pankreassaftes erfolgt, zu berücksichtigen. Dabei soll im Hinblick auf die Fragestellung und die verwendete Versuchsanordnung auf die innere Sekretion des Pankreas nicht eingegangen werden.

Unter physiologischen Bedingungen findet die Sekretion des Pankreassaftes nach der Nahrungsaufnahme statt. Der Übertritt des Mageninhaltes in den Darm (Bayliss und Starling, Pawlow, Cohnheim und Klee) oder im Tierversuch das Einbringen von Säuren in das Jejunum oder Duodenum führen nach kurzer Zeit zu einer lebhaften Absonderung. Der Sekretionsakt tritt auch dann ein, wenn alle nervösen Verbindungen des Darms unterbrochen sind. Die unter physiologischen Umständen eintretende Sekretion wird, da das in den oberen Darmabschnitten gebildete, durch Aktivierung aus dem Prosekretin entstehende Sekretin über die Blutgefäße dem Pankreas zugeführt wird, als die Folge einer *humoralen Erregung* betrachtet.

Neben diesem humoralen Erregungsmodus besteht die lediglich auf dem *Wege des Reflexes* (POPIELSKI, WERTHEIMER) zustande kommende Anregung des Pankreas zur Absonderung. Experimentelle Reizung der Pankreasnerven, sowie Scheinfütterung und darauf folgende Sekretion stellen unter Beweis, daß die Sekretausschüttung der Pankreaszellen auch auf rein nervösem Wege eingeleitet werden kann.

Die Absonderung des Pankreassaftes wird also auf verschiedenen Wegen erreicht. Neben der hauptsächlich unter physiologischen Bedingungen in Erscheinung tretenden humoralen Erregung findet sich der über den Vagus ablaufende nervöse Reiz.

Die Auslösung der Sekretion und die Restitution der exkretorischen Pankreaszellen unterliegen also dem „Prinzip der doppelten Sicherung" wie die Induktion mancher Determinationsvorgänge in der frühembryonalen Entwicklung, z. B. die der Linse bei den Amphibien.

Im Hinblick auf die eingangs angedeuteten Nebenwirkungen des Penicillins beim Menschen und im Tierversuch ist man geneigt, auch für den Wirkungsmechanismus des Penicillins auf das Mäusepankreas einen nervösen Reiz anzunehmen.

Dagegen spricht allerdings die hohe Latenzzeit zwischen der Penicillininjektion und dem Einsetzen der Sekretausschüttung. Bei intravenöser Reizung mit Sekretin beträgt die Latenzzeit 1 Min., bei der Reizung der Duodenalschleimhaut 3—5 Min. Eine so lange Latenzzeit würde kaum bei einem auf dem Nervenwege ausgelösten Reflex festzustellen sein. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wäre es daher wahrscheinlicher, daß die durch Penicillin ausgelöste Sekretausschüttung auf humoralem Wege gesteuert wird.

Die Beantwortung der Frage, ob der durch Penicillin ausgelöste Sekretionsreiz des Pankreas nun über das vegetative Nervensystem zustande kommt, oder ob er eine humorale Sekretionswirkung darstellt, suchten wir durch *Ausschaltung einer Vaguswirkung* mittels Atropin zu beantworten.

Die Lebendbeobachtung des Pankreas wurde bei 8 Mäusen wie in den vorhergehenden Versuchen durchgeführt. 45 Min. vor der subkutanen Penicillininjektion wurde den Tieren 0,14 mg/kg Atropin subkutan verabfolgt. Nach Beendigung der Lebendbeobachtung wurde jeweils das Pankreas ausgeschnitten und in verschiedenen Stufen mit Toluidinblau vital gefärbt.

Während der jeweils 3 Stunden dauernden Lebendbeobachtung konnten *keine morphologischen Veränderungen in den Drüsenzellen* festgestellt werden. In keinem Falle trat eine Sekretausschüttung aus den gleichmäßig gestapelten Drüsenzellen und auch keine Lipochondrienzerschnürung, welche beide Faktoren als die wichtigsten Kriterien für unsere Untersuchungen zu gelten haben, ein. Auch die Tiere, die 2mal (2×300 OE Penicillin) Penicillin erhielten, zeigten keine Veränderungen der exokrinen Zellen.

Nach *Vitalfärbung* wurde lediglich bei einer Maus eine Anschwellung der Lipochondrien, das Vorstadium einer Abschnürung von Tochtergranula, gefunden. Eine Extrusion war jedoch nicht eingetreten. Die übrigen Tiere zeigten bei vitaler Anfärbung des Pankreas eine elektive Farbspeicherung in den Lipochondrien, teilweise auch in den Mitochondrien. Die Zymogengranula hoben sich als in größerer Menge in den apikalen Zellteilen gelagerte Körnchen ab. Bei keinem Tier gelangte der Golgiapparat zur Darstellung, welcher nach Pilokarpin und nach Penicillin ohne vorhergehende Atropinblockade bald nach Beginn des Arbeitsrhythmus in osmierten Präparaten sichtbar wird. Dabei liegt die Golgisubstanz anfänglich den Reifungsgranula kappen- oder halbmondförmig an; später schiebt sie sich netzförmig zwischen die letzteren ein. Vitalfarbstoffe werden im Bereich des Golgiapparates ausgeflockt. Beim typischen Stapel- oder Ruhepankreas erfolgt keine Farbstoffspeicherung im Bereich des Golgiapparates. Bei einwandfrei vitalgefärbten Präparaten beweist das Fehlen einer Farbstoffausflockung im Golgibereich umgekehrt, daß der Arbeitsrhythmus nicht ausgelöst wurde.

Es gelang bei dieser Versuchsanordnung nicht, eine Sekretausschüttung in den exokrinen Pankreaszellen auszulösen. Durch experimentelle *Blockade einer Vaguswirkung* mit Hilfe von Atropin scheint es also möglich zu sein, den *Wirkungsmechanismus des Penicillins auf das Pankreas zu unterbrechen.*

Die Hemmung der Sekretextrusion der exokrinen Pankreaszellen durch Atropin steht übrigens im Einklang mit der Ausschaltung der Speichel- und Tränendrüsensekretion durch Atropin, welche auch durch Pilokarpin ausgelöst werden kann.

Andererseits erlaubt unsere Versuchsanordnung nicht den Schluß, daß die cholinergische Nervenreizung des Pankreas durch Atropin sicher unterbrochen wurde. Hier wäre zu berücksichtigen, daß beispielsweise sehr kleine Dosen von Atropin die Vagusfasern der Bronchien völlig lähmen, daß jedoch die Wirkung der motorischen Vagusfasern zum Magen durch Atropin nur abgeschwächt, aber nicht gänzlich aufgehoben werden kann. Noch resistenter gegen Atropin sind die motorischen Vaguswirkungen auf den Darm (Gaddum). Demgegenüber aber sind die Wirkungen von muskarinartigen Pharmaka auf diese Gewebe, also dann, wenn diese in den Zustand der Vagotonie versetzt werden, schon durch kleine Atropindosen zu beseitigen (Heffter, Gaddum, Eichholtz).

Bezüglich der *Deutung unserer Befunde* könnte angenommen werden, daß die Atropinblockade bei einer humoralen Erregung des Pankreas durch Penicillin ohne Wirkung bleibt und die Pankreaszellen trotzdem extruieren (Babkin, Rosemann). Das Ergebnis, daß die Acini nach Ausschaltung einer Parasympathikuserregung und auch nach wiederholter Penicillin-Injektion nicht extruieren, scheint uns dafür zu sprechen, daß Penicillin nicht über eine humorale Erregung zur Wirkung gelangt. Penicillin entfaltet seinen Effekt offenbar doch über das parasympathische Nervensystem. Um diesen vermuteten Wirkungsmechanismus sicherzustellen, bedarf es noch weiterer Beobachtungen, wobei unter anderem versucht werden müßte, den Nachweis von Acetylcholin nach der Penicillin-Injektion zu führen.

In geeigneten Versuchen müßte schließlich auch der Frage nachgegangen werden, ob der beschriebene Effekt dem chemisch reinen Penicillin oder einem Ballaststoff der heutigen Handelspräparate zuzuschreiben ist.

Unserer Erklärung zufolge würde *Penicillin* zu einer *Erregung des Vagus* führen und diese veranlaßt die Pankreaszellen zur Sekretausschüttung. Die vorliegenden Tierversuche legen nahe, daß Penicillin

bezüglich seiner Wirkung auf das Pankreas der Maus dem Pilokarpin an die Seite zu stellen ist. Doch bleibt es unentschieden, ob wir in dem Penicillin eine parasympathikotrope Substanz im eigentlichen Sinne erblicken dürfen.

Der Befund bedeutet eine Stütze für die eingangs ausgesprochene Vermutung, daß eine Reihe von Penicillinnebenwirkungen beim Menschen und beim Versuchstier mit einer Erregung des Parasympathikus in Beziehung gebracht werden können.

Zusammenfassung.

1. An Hand von in vivo- und in situ-Beobachtungen wurde der Einfluß von Penicillin auf den Arbeitsrhythmus der exokrinen Pankreaszellen der Maus untersucht.

2. Penicillin ist imstande, die Drüsenacini zur Sekretausschüttung zu veranlassen und den Arbeitsrhythmus analog zu den nach Pilokarpin ablaufenden Phasen einzuleiten.

3. Nach Atropinblockade scheint Penicillin nicht mehr imstande zu sein, die Sekretausschüttung der Pankreaszelle zu bewerkstelligen. Daraus wird geschlossen, daß dem Wirkungsmechanismus auf die exokrine Pankreaszelle möglicherweise kein humoraler Reiz, sondern eher eine Vaguserregung zugrunde liegt.

4. Mit einer durch Penicillin verursachten Erhöhung des Vagotonus würde sich eine Reihe von Penicillinnebenwirkungen beim Menschen und im Tierversuch erklären lassen.

Literatur.

Babkin, B. P.: In Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, von Bethe u. Bergmann, Bd. III. Berlin: Springer 1927. — Blaich, W.: Ref. Derm. Wschr. **1948**. — Klin. Wschr. **1948**, 306. — Ref. Z. Hautkrkh. **1948**. — Blaich, W., u. Fr. Ehring: Arch. Derm. (im Druck). — Covell, W. P.: Anat. Rec. **40**, 213 (1928). — Emanuel, R.: Z. Geburtsh. **124**, 44 (1942). — Gaddum, J. H.: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig: Georg Thieme 1936. — Guggisberg, H.: Schweiz. med. Wschr. **1940**, 825. — Heffter, A.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II/2. Berlin: Springer 1924. — Hirsch, G. Chr.: Z. Zellforsch. **14**, 517 (1931); **15**, 36 (1932). — Verh. dtsch. Zool. Ges. **1931**. — Hirsch-Hoffmann, H. U.: Z. Geburtsh. **103**, 445 (1932). — Arch. Gynäk. **156**, 24 (1934). — Kalbfleisch: Allgemeine pathologische Schriften, Bd. VI, S. 117. — Kraul, L.: Arch. Gynäk. **131**, 600 (1927); **132**, 4 (1927). — Landois-Rosemann: Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1929. — Maltesos, C., u. R. H. Watson: Pflügers Arch. **241**, 516 (1939). — Maltesos, C., u. R. Weigmann: Pflügers Arch. **241**, 641 (1939). — Ries, E.: Z. Zellforsch. usw. **22/4**, 523 (1935). — Grundriß der Histophysiologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1938. — Die übrigen bei Babkin, Landois u. Rosemann.

Priv.-Dozent Dr. Wilhelm Blaich, Münster,
Hautklinik der Westfälischen Landes-Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 99—108 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Die Reduktion des Hämiglobins *.

VI. Mitteilung.

Die von reversibel reduzierbaren Farbstoffen katalysierte Reduktion.

Von

Manfred Kiese.

(Eingegangen am 2. Dezember 1948.)

In früheren Untersuchungen[1, 2] ist nachgewiesen worden, daß reversibel reduzierbare Farbstoffe die Reduktion des Hämiglobins in roten (braunen) Zellen durch Milchsäure und Phosphoglyzerinaldehyd nur wenig beschleunigen und daß die Beschleunigung der Hämiglobinreduktion durch Farbstoffe in den braunen Zellen der katalytischen Wirkung auf ein anderes System zuzuschreiben ist. Als dieses System wurde Warburgs Zwischenferment mit Triphosphopyridinnukleotid und Hämiglobinreduktase und Glukose-6-phosphat (Robison-Ester) als Substrat angenommen, ein System, das Farbstoffe schnell reduziert, wie Warburg, Kubowitz und Christian[3, 4] gezeigt haben. Allein reduziert es Hämiglobin nur langsam, in Gegenwart von Farbstoffen aber sehr schnell. Wir haben den Stoffwechsel in braunen Zellen bei Reduktion von Hämiglobin durch Glukose in Gegenwart von Farbstoffen und im Hämolysat bei Reduktion durch Robison-Ester in Gegenwart von Farbstoffen verglichen und dabei Übereinstimmungen gefunden, die die frühere Annahme bestätigen.

Inzwischen hat Gibson[5] Untersuchungen veröffentlicht, durch die ebenfalls gezeigt wird, daß die Farbstoffe die Reduktion des Hämiglobins durch Milchsäure und durch Phosphoglyzerinaldehyd nur wenig beschleunigen. Auch Gibson findet, daß im Hämolysat Hämiglobin durch Glukose-6-phosphat bei Gegenwart von Methylenblau schnell reduziert wird und betrachtet das Zwischenferment-Hämiglobinreduktase-System als dasjenige, dessen Reduktionsgeschwindigkeit durch die Farbstoffe am stärksten beschleunigt wird.

A. Methoden.

Die Untersuchungen wurden an roten Zellen von Menschen durchgeführt. Hämiglobin wurde in ihnen durch Nitrit gebildet und dieses danach durch 4- bis 5maliges Waschen auf der Zentrifuge entfernt. Die Zellen wurden in Phosphat-Ringerlösung suspendiert, die aus 1 Teil isotoner Natrium-Phosphatlösung und 19 Teilen Ringerlösung (90 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,24 g $CaCl_2$, 0,025 g $MgCl_2$ und Wasser ad 1000 ml) bestand. Die Wasserstoffionenkonzentration war $p_H = 7{,}1$. Als Farbstoff wurde Toludinblau benutzt.

* V. Mitteilung; Arch. exper. Path. (D.) **204**, 451 (1947).

Zur Herstellung möglichst konzentrierter Hämolysate wurden die Zellen nach dem Waschen 3mal gefroren und danach die Stromata abzentrifugiert. Glukose-6-phosphat war nach den Angaben von WARBURG und CHRISTIAN[6] und Hexosediphosphat nach denen von NEUBERG und KOBEL[7] dargestellt worden, beide Ester wurden als Natriumsalze verwendet.

Die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins wurde unter Ausschluß von Sauerstoff gemessen. Die Versuchsansätze wurden zunächst in einem größeren Gefäß bei Zimmertemperatur durch Überleiten von sauerstofffreiem Kohlenoxyd und Schütteln vom Sauerstoff befreit und mit Kohlenoxyd gesättigt. Dann wurden Proben für die einzelnen Bestimmungen entnommen und der Ansatz in ERLENMEYER-Kolben von 25 oder 50 ml Inhalt gefüllt, 2 oder 3 größere Glasperlen hinzugegeben, und diese Kolben ohne Bildung eines Gasraumes mit einem durchbohrten und mit Hahn versehenen Stopfen fest verschlossen. Im Wasserbad von 37° wurden die Kolben bestimmte Zeit geschüttelt, danach geöffnet und wiederum die gleichen Analysen durchgeführt.

Hämiglobin wurde photometrisch nach der Methode von EVELYN[8] und HAVEMANN[9] gemessen, der Gesamtblutfarbstoff ebenfalls als Hämiglobin nach Oxydation des Hämoglobins mit Ferrizyanid. Der Gehalt an Kohlensäure wurde manometrisch nach VAN SLYKE und NEIL[10, 11], der Gehalt an Glukose jodometrisch nach HAGEDORN und JENSEN[12], Milchsäure teils jodometrisch nach FÜRTH und CHARNASS[11], teils manometrisch nach AVERY und HASTINGS[13], Brenztraubensäure photometrisch nach LU[14], freies Phosphat gravimetrisch als Strychninphosphormolybdat nach EMBDEN[15] und das aus den leicht hydrolysierbaren Phosphaten durch Hydrolyse in normaler Säure in 30 Min. abgespaltene Phosphat sowie das Gesamtphosphat gravimetrisch als Ammoniumphosphormolybdat nach v. LORENZ[16]. Azetaldehyd wurde nach Destillation durch CLAUSEN-Titration[17] bestimmt.

In einigen Versuchen wurden außerdem Zitronensäure, Oxalessigsäure und Äpfelsäure bestimmt.

Photometrische Messungen wurden mit dem Photometer von HAVEMANN und manometrische mit dem Gerät von VAN SLYKE durchgeführt.

B. Ergebnisse.

1. Reduktion von Hämiglobin in braunen Zellen durch Glukose.

Braune Zellen, in Phosphat-Ringerlösung suspendiert, vergoren zugesetzte Glukose zum größten Teil zu Milchsäure, zum geringeren Teil oxydierten sie zu Brenztraubensäure und Kohlensäure. Die Summe dieser 3 Säuren machte über 80% der verbrauchten Glukose aus. Milchsäure war 80% der Summe, Brenztraubensäure 17,5% und Kohlendioxyd 2,5%. Während dieser Umsetzungen wurde langsam Hämiglobin reduziert, und zwar von einer Zellsuspension, die 15 g Blutfarbstoff je 100 ml enthielt, im Mittel 0,6 Milliäquivalent Hämiglobin je Liter und Stunde. Brenztraubensäure und Kohlendioxyd entstanden mit einer Geschwindigkeit von 0,29 bzw. 0,15 Millimol je Liter und Stunde. Für jedes reduzierte Äquivalent Hämiglobin wurden also 0,5 Mole Brenztraubensäure und 0,25 Mole Kohlendioxyd gebildet.

In allen Ansätzen, auch in Kontrollversuchen mit roten hämiglobinfreien Zellen, nahm das freie Phosphat zu, während die leicht

hydrolysierbaren Phosphate (Hydrolyse 30 Min. in 1 n Säure) konstant blieben.

Durch Zusatz von Toluidinblau in einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l wurde die Reduktionsgeschwindigkeit auf den 12fachen Wert, 7,1 Milliäquivalent je Liter und Stunde, erhöht. Gleichzeitig wurde der Zuckerverbrauch um 70% erhöht, während die Milchsäurebildung gleichblieb. Die Brenztraubensäurebildung wurde nur wenig beschleunigt, die Kohlendioxydbildung aber auf den 14fachen Wert erhöht. Der Mehrverbrauch der Glukose entsprach ungefähr der Zunahme der Kohlendioxyd- und Brenztraubensäurebildung. Bei der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin wurden in Gegenwart von Toluidinblau 0,3 Mole Kohlendioxyd und 0,055 Mole Brenztraubensäure gebildet (Tabelle 1). Die Freisetzung von Phosphat war ein wenig langsamer als ohne Zusatz von Toluidinblau.

2. Reduktion von Hämiglobin in braunen Hämolysaten durch Glukose-6-phosphat.

In braunen Hämolysaten, denen Glukose-6-phosphat als Substrat zugesetzt war, verlief die Reduktion des Hämiglobins langsamer als in braunen Zellen mit Glukose als Substrat. Es wurden nur 0,35 Äquivalente Hämiglobin je Liter und Stunde reduziert. Auch die Bildung von Brenztraubensäure und Kohlendioxyd war geringer. Je reduziertem Äquivalent Hämiglobin traten 0,3 Mole Brenztraubensäure und 0,17 Mole Kohlendioxyd auf (Tabelle 2).

Gegenüber diesen langsamen Reaktionen verlief die Milchsäurebildung fast ebenso schnell wie in Zellen und die Freisetzung von Phosphat sogar schneller. Die Konzentration an leicht hydrolisierbaren Phosphaten nahm in den Versuchen teils ein wenig zu, teils ein wenig ab und blieb im Mittel gleich.

Toluidinblau in der Konzentration von $6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l beschleunigte die Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion auf den 6fachen Wert. Während die Milchsäurebildung und Phosphatabspaltung mit unveränderter Geschwindigkeit weiterliefen und die Brenztraubensäurebildung nur wenig zunahm, stieg die Kohlendioxydbildung auf den 10fachen Wert, so daß je reduziertem Äquivalent Hämiglobin 0,28 Mole Kohlendioxyd gebildet wurden; die Brenztraubensäurebildung betrug nur 0,08 Mole je Äquivalent Hämiglobin (Tabelle 3).

3. Reduktion von Hämiglobin in braunen Hämolysaten durch Hexosediphosphat.

Die Bildung von Milchsäure und Brenztraubensäure sowie die Phosphatabspaltung verlief schneller in braunen Hämolysaten, wenn statt Glukose-6-phosphat Hexosediphosphat als Substrat zugesetzt

Tabelle 1. *Geschwindigkeit der Reduktion von Hämiglobin und der Bildung von Milchsäure, Brenztraubensäure, Kohlendioxyd und freiem Phosphat in braunen Zellen des Menschen. Suspensionen von Zellen in Phosphat-Ringerlösung mit einem Blutfarbstoffgehalt von 15 g/100 ml, davon 14,0—14,5 g/100 ml Hämiglobin. Glukosekonzentration 200 mg/100 ml. Temperatur 37° C.*
Die Werte sind die Mittel und die Streuung der Einzelwerte von 7 gleichartigen Versuchen an Zellen verschiedener Individuen.

	Hämiglobin Milliäquivalent je Liter und Stunde	Glukose Millimol je Liter und Stunde	Milchsäure Millimol je Liter und Stunde	Brenztraubensäure Millimol je Liter und Stunde	Kohlendioxyd Millimol je Liter und Stunde	Freies Phosphat Millimol je Liter und Stunde
Braune Zellen ohne Farbstoff	$-0{,}61 \pm 0{,}1$	$-1{,}0 \pm 0{,}2$	$+1{,}3 \pm 0{,}3$	$+0{,}29 \pm 0{,}06$	$+0{,}15 \pm 0{,}015$	$+0{,}36 \pm 0{,}12$
Braune Zellen mit 6×10^{-5} Mol/l Toluidinblau	$-7{,}1 \pm 0{,}9$	$-1{,}5 \pm 0{,}3$	$+1{,}4 \pm 0{,}3$	$+0{,}39 \pm 0{,}1$	$+2{,}1 \pm 0{,}5$	$+0{,}25 \pm 0{,}1$

Tabelle 2. *Geschwindigkeit der Reduktion von Hämiglobin und der Bildung von Brenztraubensäure, Milchsäure, Kohlendioxyd und freiem Phosphat durch hämolysierte braune Zellen des Menschen mit einer Gesamtblutfarbstoffkonzentration von 25 g/100 ml, davon 22—24 g/100 ml Hämiglobin. Glukose-6-phosphat-Konzentration 200 mg/100 ml. Temperatur 37° C.*
Die Werte sind Mittel und Streuung der Einzelwerte von 5 gleichartigen Versuchen.

	Hämiglobin Milliäquivalent je Liter und Stunde	Milchsäure Millimol je Liter und Stunde	Brenztraubensäure Millimol je Liter und Stunde	Kohlendioxyd Millimol je Liter und Stunde	Freies Phosphat Millimol je Liter und Stunde
Hämolysat ohne Farbstoff .	$-0{,}35 \pm 0{,}08$	$+0{,}8 \pm 0{,}25$	$+0{,}1 \pm 0{,}03$	$+0{,}06 \pm 0{,}02$	$+0{,}9 \pm 0{,}3$
Hämolysat mit 6×10^{-5} Mol/l Toluidinblau	$-2{,}1 \pm 0{,}7$	$+0{,}8 \pm 0{,}2$	$+0{,}17 \pm 0{,}03$	$+0{,}6 \pm 0{,}2$	$+1{,}0 \pm 0{,}25$

Tabelle 3. *Geschwindigkeit der Reduktion von Hämiglobin und der Bildung von Milchsäure, Brenztraubensäure, Kohlendioxyd und freiem Phosphat durch hämolysierte braune Zellen des Menschen mit einer Gesamtfarbstoffkonzentration von 25 g/100 ml, davon 22—24 g/100 ml Hämiglobin. Hexosediphosphat-Konzentration 200 mg/100 ml. Temperatur 37° C.*
Die Werte sind Mittel und Streuung der Einzelwerte von 5 gleichartigen Versuchen.

	Hämiglobin Milliäquivalent je Liter und Stunde	Milchsäure Millimol je Liter und Stunde	Brenztraubensäure Millimol je Liter und Stunde	Kohlendioxyd Millimol je Liter und Stunde	Freies Phosphat Millimol je Liter und Stunde
Hämolysat ohne Farbstoff .	$-0{,}47 \pm 0{,}06$	$+2{,}3 \pm 0{,}6$	$+0{,}2 \pm 0{,}07$	$+0{,}04 \pm 0{,}02$	$+2{,}0 \pm 0{,}2$
Hämolysat mit 6×10^{-5} Mol/l Toluidinblau	$-0{,}98 \pm 0{,}2$	$+3{,}1 \pm 0{,}7$	$+0{,}3 \pm 0{,}1$	$+0{,}06 \pm 0{,}02$	$+2{,}4 \pm 0{,}2$

Tabelle 4. *Geschwindigkeit der Bildung von Milchsäure, Brenztraubensäure und freiem Phosphat in roten und in braunen Zellen und in Hämolysaten des Menschen in Kohlenoxydatmosphäre bei 37° C.*
Mittel aus 2 bzw. 3 Versuchen.

Zellen	Substrat	Hb-Konzentration g/100 ml	Milchsäure Millimol je Liter und Stunde	Brenztraubensäure Millimol je Liter und Stunde	Freies Phosphat Millimol je Liter und Stunde	Glukose Millimol je Liter und Stunde
Rote Zellen	—	15	+ 0,6	+ 0,39	+ 1,4	—
Rote Zellen	Glukose 0,2 g/100 ml	15	+ 1,4	+ 0,25	+ 0,4	1,0
Rotes Hämolysat	*Robison*-Ester 0,2 g/100 ml	25	+ 0,4	+ 0,13	+ 0,5	—
Braune Zellen	—	15	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,8	—
Braunes Hämolysat	—	25	+ 0,2	+ 0,48	+ 0,6	-

wurde. Andererseits verlief die Bildung von Kohlendioxyd langsamer und die Reduktion des Hämiglobins ein wenig schneller (Tabelle 3). Während der Reduktion eines Äquivalents Hämiglobin entstanden 0,45 Mole Brenztraubensäure und 0,08 Mole Kohlendioxyd.

Toluidinblau beschleunigte die Reduktion des Hämiglobins nur bis zur doppelten Geschwindigkeit und erhöhte die Geschwindigkeit der Bildung von Brenztraubensäure und Kohlendioxyd um die Hälfte, so daß bei Reduktion eines Äquivalentes Hämiglobin 0,3 Mole Brenztraubensäure und 0,06 Mole Kohlendioxyd gebildet wurden. Außerdem verlief auch die Milchsäurebildung schneller.

4. Bildung von Milchsäure, Brenztraubensäure und freiem Phosphat in Zellen und Hämolysaten ohne Hämiglobin bzw. ohne Zusatz von Substrat.

Die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Messungsergebnisse zeigen, daß für die Beantwortung der eingangs gestellten Frage die Bildung von Kohlendioxyd ein entscheidendes Kriterium ist, um so mehr, als rote Zellen und Hämolysate ohne Hämiglobin Kohlendioxyd — wenn überhaupt — nur mit Geschwindigkeiten bilden, deren Bestimmung mit den angewandten Methoden nicht sicher möglich ist, die also sehr gering sind. Demgegenüber ist die Bewertung des anderen Oxydationsproduktes, der Brenztraubensäure, schon nach den Werten der Tabellen 1—3 weit schwieriger und wird noch unsicherer bei Berücksichtigung der Brenztraubensäurebildung in roten Zellen und Hämolysaten mit Glukose bzw. Glukose-6-phosphat als Substrat und in roten und braunen Zellen sowie braunen Hämolysaten ohne Zusatz von Substrat. Entsprechende Daten sind zusammen mit solchen über Bildung von Milchsäure und Abspaltung von Phosphat in Tabelle 4 wiedergegeben. Aus dieser ist zu ersehen, daß in roten Zellen auch ohne Zusatz von Glukose Milchsäure gebildet wurde. Die Bildungsgeschwindigkeit war geringer als bei Gegenwart von Glukose und sank mit der Zeit ab. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die erste Stunde. In braunen Zellen ohne Zusatz von Glukose war die Milchsäurebildung etwa ebenso groß wie in roten, dagegen im roten Hämolysat mit Glukose-6-phosphat geringer als im braunen, und noch geringer im braunen Hämolysat ohne Zusatz von Substrat.

Die Bildung von Brenztraubensäure war nicht an die Reduktion von Hämiglobin gebunden, vielmehr wurden auch in roten Zellen bei Gegenwart von Glukose Brenztraubensäuremengen gebildet, die denen in braunen Zellen nur wenig nachstehen. Ohne Zusatz von Glukose bildeten rote Zellen sogar schneller Brenztraubensäure und braune wiederum mehr. Auch braunes Hämolysat bildete schneller Brenztraubensäure ohne Zusatz von Substrat als mit Zusatz von Glukose-6-phosphat.

Die Abspaltung von Phosphat verlief in roten Zellen ohne Glukose schneller als mit Glukose, im roten Hämolysat mit Glukose-6-phosphat schneller als im braunen.

C. Besprechung.

Während der durch Toluidinblau beschleunigten Reduktion von Hämiglobin durch Glukose werden verhältnismäßig große Mengen Kohlendioxyd gebildet, in braunen Zellen 0,3 Mole je Äquivalent reduzierten Hämiglobins, d. h. es werden nur $3^1/_3$ Äquivalente Hämiglobin benötigt, um 1 Mol Kohlendioxyd freizusetzen. Das gleiche Verhältnis von Hämiglobin zu Kohlendioxyd wird bei der vom Toluidinblau beschleunigten Reduktion im braunen Hämolysat gefunden, wenn Glukose-6-phosphat als Substrat dient. Andererseits werden im braunen Hämolysat nur 0,06 Mole Kohlendioxyd je Äquivalent Hämiglobin (1 Kohlendioxyd auf 17 Äquivalente Hämiglobin) gebildet, wenn Hexosediphosphat Substrat ist. Es ist demnach anzunehmen, daß die katalytische Wirkung der Farbstoffe weit mehr als andere Fermentsysteme dasjenige betrifft, das Glukose-6-phosphat oxydiert. Denn die Reduktion von Hämiglobin im braunen Hämolysat durch Hexosediphosphat liefert nur minimale Mengen Kohlendioxyd (0,06 Mole je Äquivalent Hämiglobin) und statt dessen Brenztraubensäure auf dem Wege über Phosphoglyzerinaldehyd.

Wir hatten schon früher auf Grund von Stoffwechseluntersuchungen und Hemmungen sowie wegen der die anderen Hämiglobin reduzierenden Systeme weit übertreffenden Empfindlichkeit dieses System als das wichtigste für die katalytische Wirkung der Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins bezeichnet und auch darauf hingewiesen, daß es bei mehreren Tierarten in Abwesenheit von katalytischen Farbstoffen an der Reduktion des Hämiglobins nur wenig beteiligt ist[2]. In den roten Zellen des Menschen ist seine Mitwirkung jedoch durch die Kohlendioxydbildung auch in Abwesenheit von Farbstoffen nachweisbar.

Nunmehr liegen mehrere widerspruchslose, beweiskräftige Beobachtungen vor, die die Identität des Systems Triphosphopyridinnukleotid-Hämiglobinreduktase mit dem für die katalytische Wirkung der Farbstoffe empfindlichsten System identifizieren: die starke Wirkung der Farbstoffe, die Bildung von Kohlendioxyd, die sehr geringe Bildung von Brenztraubensäure, die praktisch fehlende Bildung von Kohlendioxyd bei der Reduktion von Hämiglobin durch Hexosediphosphat und Milchsäure und statt dessen Bildung äquivalenter oder fast äquivalenter Mengen von Brenztraubensäure. Damit ist der Wirkungsmechanismus der Farbstoffe bei der Reduktion des Hämiglobins aufgeklärt und für eine Gruppe von Giften die

Beschreibung wenigstens einer wesentlichen ihrer Wirkungen mit chemischen Formeln möglich. Ungeklärt bleiben noch einige Reaktionen dieses Systems mit anderen Fermenten und Substraten als dem „Zwischenferment" und Glukose-6-phosphat.

Die Farbstoffe werden von hydrierter Hämiglobinreduktase reduziert. Diese wird wiederum von Triphospho-dihydro-pyridinnukleotid reduziert.

Der Mechanismus der Bildung von Kohlendioxyd bei der Reduktion des Hämiglobins ist noch nicht sicher anzugeben. Zur Freisetzung eines Moles Kohlendioxyd werden nur 3,3 Äquivalente Hämiglobin benötigt, während 4 zur Oxydation eines Kohlenstoffs im Zucker zu Kohlendioxyd erforderlich sind. Bereits WARBURG, KUBOWITZ und CHRISTIAN [3], die das ROBISON-Ester-System und seine Empfindlichkeit für Farbstoffe entdeckten und seine Oxydation durch Sauerstoff untersuchten, fanden in Kaninchenzellen einen Überschuß von Oxydationsprodukten gegenüber der Sauerstoffaufnahme, nämlich die Bildung von 0,8 Molen Kohlendioxyd und 1,76 Molen Brenztraubensäure für ein aufgenommenes Mol Sauerstoff. Andererseits erhielten WARBURG und CHRISTIAN [18] bei der Oxydation des ROBISON-Esters mit gereinigtem Zwischenferment und Triphosphopyridinnukleotid für 1 Mol Sauerstoff 0,75 Mole Kohlendioxyd und 0,24 Mole Azetaldehyd. Später wiesen WARBURG, CHRISTIAN und GRIESE [19], NEGELEIN und HAAS [20], NEGELEIN und GERISCHER [21] sowie WARBURG und CHRISTIAN [22] mit gereinigtem Zwischenferment aus Hefe Phosphohexonsäure als erstes Oxydationsprodukt des ROBISON-Esters nach, das durch Zusatz anderer Proteine weiter abgebaut werden konnte. Die Bildung von Kohlendioxyd aus dem ROBISON-Ester beansprucht also mehrere Fermente, die sich mit Triphosphopyridinnukleotid verbinden können, um es mit verschiedenen Substraten reaktionsfähig zu machen (s. auch DICKENS [23]). Diese Fermente erhalten aber erst Substrat, nachdem Triphosphopyridinnukleotid-Zwischenferment ROBISON-Ester dehydriert hat. Sie reagieren aber sehr schnell mit ihren Substraten, denn die schnelle Bildung von Kohlendioxyd schließt eine Anreicherung von Zwischenprodukten des Abbaus des ROBISON-Esters aus.

Brenztraubensäure kommt in unseren Versuchen als Quelle des Kohlendioxyds kaum in Frage, da sie sich bei der Reduktion des Hämiglobins anreichert. Außerdem wäre dann auch bei der Reduktion des Hämiglobins durch Hexosediphosphat eine noch größere Menge Kohlendioxyd zu erwarten. Ebenso ist auszuschließen, daß neben dem Hämiglobin noch Sauerstoff in nennenswerter Konzentration vorhanden war und Glukose oxydierte.

Ob das überschüssige Kohlendioxyd aus dem Zerfall von Verbindungen aus dem Zitronensäurezyklus stammt, vermögen wir noch

nicht zu beurteilen. Unsere darauf gerichteten Untersuchungen haben die Bedeutung dieses Systems für die Hämiglobinreduktion noch nicht klären können. Daß Fumarsäure und Äpfelsäure, aber nicht Bernsteinsäure Hämiglobin reduzieren können, ist früher schon mitgeteilt worden[2].

Auf den Ablauf noch anderer Reaktionen im Kohlenhydratabbau der roten Zellen mit und ohne Hämiglobinreduktion weist auch das Auftreten der Brenztraubensäure hin. Wir hatten bei früheren Messungen beobachtet, daß in den roten Zellen der Hämiglobin langsam reduzierenden Tierarten bei der Hämiglobinreduktion fast äquivalente Mengen Brenztraubensäure gebildet werden. In den wenigen Untersuchungen der Brenztraubensäurebildung in hämiglobinfreien Zellen vom Menschen unter Ausschluß von Sauerstoff ($CO + 5\% CO_2$) fanden wir nur geringe Brenztraubensäurebildung, 0,06 und 0,08 Millimol je Liter und Stunde. In den neuen Untersuchungen, allerdings ohne Kohlendioxyd, fanden wir 0,25 Millimol je Liter und Stunde und ohne Zusatz von Substrat noch höhere Werte, 0,4 Millimol je Liter und Stunde. Auch in braunen Zellen und braunen Hämolysaten wurde ohne Zusatz von Substrat mehr Brenztraubensäure gebildet als mit Substrat. Gibson[5] fand ebenfalls in roten Zellen ohne Zusatz von Glukose eine schnellere Brenztraubensäurebildung als in braunen Zellen mit Glukose und Reduktion von Hämiglobin. Dadurch wird die Bewertung der Brenztraubensäurebildung bei der Hämiglobinreduktion, insbesondere in den langsam reduzierenden Zellarten, erschwert, denn man kann nicht mit Sicherheit annehmen, daß die Hemmung der Brenztraubensäurebildung durch Glukose in roten und braunen Zellen ganz gleich ist.

Parallel mit der schnelleren Brenztraubensäurebildung in Zellen und Hämolysaten ohne Zusatz von Substrat geht eine schnellere Abspaltung von Phosphat. Die beiden Vorgänge sind nach Untersuchungen von Jost[24] als zusammenhängend anzunehmen, da er bei Phosphataufnahme der roten Zellen in Gegenwart von Glukose eine Zunahme von Diphosphoglyzerinsäure in den roten Zellen fand und bei Phosphatfreisetzung eine Abnahme der Diphosphoglyzerinsäure. Durch den Ausfall anderer energieliefernder Gärungsreaktionen kommt es zum Zerfall der Phosphoglyzerinsäure. Der Mechanismus der Hemmung des Zerfalls durch Glukose ist noch nicht völlig klar.

Bei der Bestimmung von Azetaldehyd durch Überführen mit dem Luftstrom aus dem Trichloressigsäurefiltrat in Bisulfit fanden wir kleine Mengen eines flüchtigen Aldehyds oder Ketons, die sich während der Hämiglobinreduktion nur wenig änderten und weder bei der Reduktion in Zellen noch in Hämolysaten regelmäßig zunahmen.

Zusammenfassung.

Bei der durch reversibel reduzierbare Farbstoffe beschleunigten Reduktion des Hämiglobins in braunen Zellen werden je Äquivalent reduzierten Hämiglobins 0,3 Mole Kohlendioxyd gebildet. Die gleiche Kohlendioxydbildung wird bei der Reduktion von Hämiglobin in braunen Hämolysaten in Gegenwart von Farbstoffen und Glukose-6-phosphat als Substrat gefunden. Andererseits wird die Reduktion des Hämiglobins in braunen Hämolysaten durch Hexosediphosphat von Farbstoffen weniger beschleunigt als die durch Glukose-6-phosphat und es werden bei dieser Reaktion nur sehr geringe Mengen Kohlendioxyd gebildet, nämlich 0,06 Mole Kohlendioxyd je Äquivalent reduzierten Hämiglobins.

Dadurch wird zusammen mit früheren Untersuchungsergebnissen bewiesen, daß die Farbstoffe weit mehr als andere Reaktionen die Reduktion des Hämiglobins durch das System Hämiglobinreduktase Triphosphopyridinnukleotid-„Trägerprotein" beschleunigen. „Trägerprotein" sind nicht nur das „Zwischenferment", sondern auch noch andere Kolloide, da der Abbau des Glukose-6-phosphats bis zum Kohlendioxyd verläuft.

Fräulein Edith Dohme habe ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen zu danken.

Literatur.

[1] Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [2] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 267 (1947). — Klin. Wschr. **1946**, 81. — [3] Warburg, O., F. Kubowitz u. W. Christian: Biochem. Z. **227**, 245 (1930). — [4] Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **242**, 206 (1931). — [5] Gibson, H.: Biochem. J. (Brit.) **42**, 13 (1948). — [6] Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **254**, 438 (1932). — [7] Neuberg, C., u. M. Kobel: In Oppenheimer-Pincussen, Die Methodik der Fermente. Leipzig 1929. — [8] Evelyn, K. A., and H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [9] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [10] van Slyke, D. D., and J. M. Neil: J. biol. Chem. (Am.) **61**, 523 (1924). — [11] Peters, J. P., and D. D. van Slyke: Quantitative Clinical Chemistry, Bd. II, London 1932. — [12] Hagedorn, H. C., u. B. N. Jensen: Biochem. Z. **135**, 46 (1923). — [13] Avery, B. E., u. A. B. Hastings: J. biol. Chem. (Am.) **94**, 273 (1931). — [14] Lu, G. D.: Biochem. J. (Brit.) **33**, 249 (1939). — [15] Embden, G.: Z. physiol. Chem. **113**, 138 (1921). — [16] Lorenz, N. v.: Z. anal. Chem. **51**, 161 (1912). — [17] Clausen, S. W.: J. biol. Chem. (Am.) **52**, 263 (1922). — [18] Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **242**, 206 (1931). — [19] Warburg, O., W. Christian u. A. Griese: Biochem. Z. **282**, 157 (1935). — [20] Negelein, E., u. E. Haas: Biochem. Z. **282**, 206 (1935). — [21] Negelein, E., u. W. Gerischer: Biochem. Z. **284**, 289 (1936). — [22] Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **292**, 287 (1937). — [23] Dickens, F.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1626 (1938). — [24] Jost, H.: Z. physiol. Chem. **165**, 171 (1927).

Prof. Dr. M. Kiese, (24b) Kiel, Feldstr. 12.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 109—114 (1949).

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Schmincke).

Über eine Methode der qualitativen Bestimmung von Giftwirkungen auf Fermentsysteme der Zellatmung*.

Von

Volker Becker.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 13. Januar 1949.)

Anläßlich der Untersuchungen W. Doerrs über den Alloxandiabetes und andere diabetogene Stoffe wurde an unserem Institut der Frage nachgegangen, wie diese Stoffe auf die *Zellatmung* wirken. Es sollten *qualitative* Giftwirkungen auf das Zytochromsystem einerseits und das Dehydrasensystem andererseits erfaßt werden. Über die Ergebnisse dieser Arbeiten wird später berichtet. Im folgenden soll die Methode dieser Untersuchungen dargestellt werden.

Giftwirkungen auf das Zytochromsystem sind physikalisch und chemisch einfach darzustellen. Noch einfacher für die qualitative Fragestellung ist die histiochemische Methode der Nadireaktion von Graeff, seitdem Keilin festgestellt hat, daß zur Nadireaktion das Zytochromsystem notwendig ist. Bei ihr oxydiert die Zytochromoxydase (Warburgs Atmungsferment, Indophenoloxydase) eines unfixierten Gefrierschnittes über die Zytochromreihe das sog. Nadigemisch, das aus α-Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiamin zu gleichen Teilen in einem Puffergemisch besteht. Hierbei entsteht im Protoplasma Indophenolblau, das sich im Gewebe in tiefblauen Granula niederschlägt. Diese Granula lassen, wie Graeff und erst kürzlich Schümmelfeder zeigten, keinen Schluß auf die Lokalisation des Fermentes zu, aber sie beweisen die Anwesenheit eines *ungeschädigten* Zytochromoxydase-Zytochromsystems (Warburg-Keilin-System). Fügt man dem Nadigemisch unter Erhaltung des optimalen p_H-Wertes den zu untersuchenden Stoff in steigender Konzentration zu, so kann man nach einer vorgeschriebenen Zeit — meist nach 15 Min. — im Vergleich mit einer Kontrolle, das Nichteintreten der Blaufärbung in den Gläschen beobachten, in denen die zugesetzte Substanz die Oxydase hemmt. Um eine ganz eindeutige Entweder-Oder-Reaktion zu erhalten, kann man den Schnitt mehrere Stunden im Gemisch belassen, wobei dann aber der Kontrollschnitt tiefblau bis schwarzblau granuliert ist.

* Unter Leitung von Prof. Dr. Wilhelm Doerr.

Ohne auf die einzelnen Versuche näher eingehen zu wollen, füge ich als Beispiel eine Tabelle der Einwirkung des Alloxans auf das Zytochromsystem an (Tabelle 1).

Wie eine Methode der qualitativen Prüfung des Häminsystems von Nutzen ist, so ist es auch eine qualitative Prüfung der Dehydrasen. Der klassische Versuch zur Darstellung des Dehydrasensystems ist die THUNBERG-Methylenblaumethode, bei der der bei 40° abgespaltene Wasserstoff durch seine Wirkung auf das Methylenblau (Mb) sichtbar gemacht wird, das er in Leukomethylenblau umwandelt. Die Mb-Methode ist ein Verfahren zur Feststellung der Zeit, die nötig ist, um einen bekannten H-Donator mit Hilfe einer Dehydrase zu dehydrieren und den abgespaltenen Wasserstoff auf eine bekannte Menge Methylenblau zu übertragen, das dadurch in seine Leukoform übergeführt wird. Selbstverständlich sind auch für den qualitativen Einblick die THUNBERG-Rohre am geeignetsten, doch standen sie uns — wie wohl vielen heute in Deutschland — nicht zur Verfügung. Wir waren daher gezwungen, auf die Einrichtung eines Allgemeinlaboratoriums zurückzugreifen. Wir entwickelten daher folgende Methoden, die sich bei unseren Fragestellungen bewährt haben.

Tabelle 1.

Nr.	Nadi cm³	Alloxan mg	Alloxan Verhältnis	Ablesezeit 15 Min.	Ablesezeit 12 Stunden
1	30,0	25	1:1200	+++	++++
2	30,0	50	1: 600	++	+++
3	30,0	75	1: 400	+	++
4	30,0	100	1: 300	—	(+)
5	30,0	300	1: 100	—	—
6	30,0	500	1: 60	—	—
7	30,0	—	—	+++	++++

++++ = schwarzblau, ++ = blau,
+++ = tiefblau, + = hellblau.

Das Wesentliche an der THUNBERG-Technik ist, daß das System H-Donator-Dehydrase-H-Akzeptor (Mb) in sauerstofffreiem Milieu aufeinander einwirken muß. Ist noch eine geringe Sauerstoffmenge vorhanden, so oxydiert diese das entstandene Leukomethylenblau wieder zu Mb zurück, und der Dehydraseneffekt wird nicht sichtbar. Der Unterschied der klassischen Methode von der unsrigen besteht darin, daß wir nicht jedes System in einem separaten Vakuum halten, sondern daß wir alle Röhrchen in einem gemeinsamen Vakuum eines gewöhnlichen Exsikkators wirken lassen. Wichtig — wie auch bei der klassischen Methode — ist, daß das Vakuum während der ganzen Wirkzeit uneingeschränkt gehalten wird. Da der ganze Exsikkator in einen Brutschrank bei 40° gestellt wird, ist das gewöhnliche leicht schmelzende Hahnenfett zur Haftung des Deckels ungeeignet und muß durch höher schmelzende Fette ersetzt werden. Beim Evakuieren muß durch mehrfaches Unterbrechen des Saugstromes verhindert werden, daß die

Muskel-stücke aus den einzelnen Röhrchen heraus-geschleudert werden. In den Exsikkator stellen wir ein besonderes Gestell, in dem die mit dem Reaktion-gemisch beschickten Gläschen hängen. Als solche benutzten wir die Mikroröhrchen der Abwehrproteinasen-Reaktion nach ABDERHALDEN, die in der Größe gerade genügen, was bei der Beschränkung des Platzes im Exsikkator von Vorteil ist. Der Exsikkator wird danach in einen Thermostaten bei 40° gestellt und durch die Glaswand beobachtet. Die Wirkzeit ist bei dieser Methode eine sehr viel längere als die der klassischen, da das „individuelle" Vakuum vollkommener ist. Wenn die Vergleich-röhrchen ohne den Hemmstoff entfärbt sind, wird der Versuch abgebrochen.

In den Röhrchen befindet sich das Reaktionsgemisch, das dem der klassischen Methode gleich ist, nämlich:

1. H-Donator: z. B. bernsteinsaures Kalium 0,5% 0,5 cm³;
2. Dehydrase: z. B. gewaschener Skelettmuskel 0,1- 0,5 g;
3. H-Akzeptor: z. B. Methylenblau 1:5000 0,5 cm³.

Daneben läuft eine Kontrolle, in der der Donator fehlt, um zu sichern, daß der übertragene Wasserstoff auch wirklich von dem angebotenen Donator stammt. Die ungewaschene Muskelflocke enthält genügend H-Donatoren, so daß sie nicht auf den angebotenen Donator angewiesen ist. Durch das Waschen gelingt es sicher nicht, den Muskel frei von Donatoren zu machen, doch der Muskel wird frei von Co-Dehydrasen, ohne die andere Donatoren nicht angreifbar sind.

Zu diesem System fügt man die zu prüfende Substanz in steigenden Konzentrationen hinzu, wobei wiederum auf die Konstanterhaltung des optimalen p_H-Wertes geachtet werden muß. Die gleiche Substanz muß aber auch noch in einer Kontrolle mitgeführt werden, bei der der Donator fehlt, um sicherzustellen, daß sie selbst keinen Wasserstoff unter Dehydrasenwirkung abgibt. Eine Tabelle sei als Beispiel angegeben (Tabelle 2).

Tabelle 2.

	1	2	3	4
H-Donator	—	Bernsteinsäure 0,5%, 0,5 g		
Dehydrase	gewaschene Muskelflocke 0,2—0,5 g			
H-Akzeptor	Methylenblau 1:5000 0,5 cm³			
Hemmkörper	—	—	Isopropyl-alkohol 10%	NaF 100 mg
Ergebnis	blau	weiß	weiß	blau
Bemerkung	Muskel keine H-Donatoren	Succino-dehydrase vorhanden	keine Hemmung	Hemmung

Diese Methode des THUNBERG-Versuches ist, das sei nochmals betont, *nicht* geeignet, über den quantitativen Dehydrasengehalt eines Organes etwas auszusagen, jedoch ist sie bei Hemmungsversuchen mit Giften zur Beantwortung rein orientierender Fragen brauchbar. Wir wandten später eine noch einfachere Methode an, auf die wir durch Arbeiten

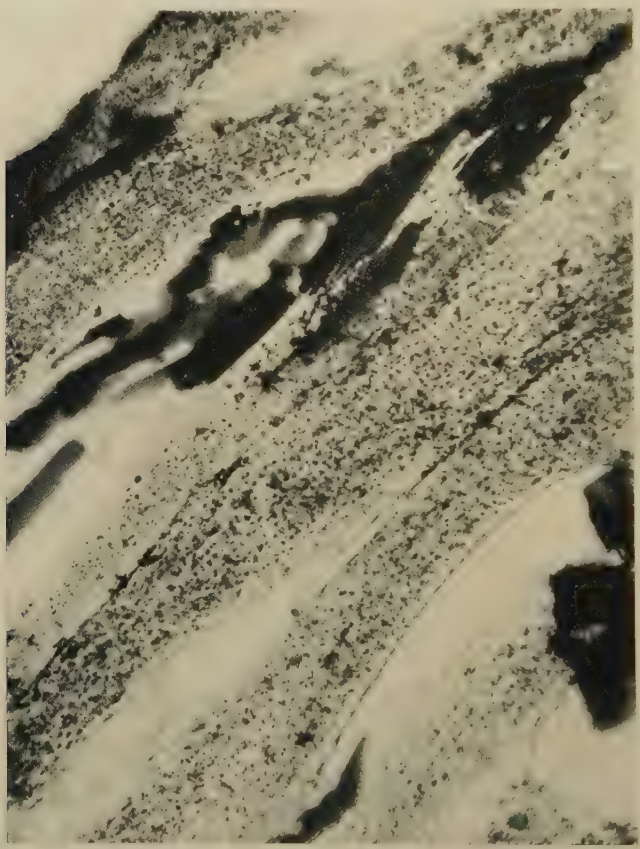


Abb. 1. Skelettmuskel Mensch, Gefrierschnitt des Muskelstückes nach Einwirkung von TTC, keine Fixierung, Zustand nach Gewebsnadireaktion am Schnitt; Schnittdicke 10 μ, Vergrößerung 380mal.

an ganz anderen Fragestellungen kamen. R. KUHN hat mit verschiedenen Mitarbeitern die Eigenschaften des Triphenyltetrazoliumchlorids in vielen Beziehungen untersucht. Das „TTC" ist ein ausgezeichneter Wasserstoffakzeptor, der sich zusammen mit dem Wasserstoff zu *rotem* Triphenylformazan umsetzt.

Das für uns Wesentliche ist, daß das TTC farblos, das Formazan aber rot ist und an der Luft nicht ohne weiteres rückoxydiert wird.

Kuhn weist auf 4 entscheidende Unterschiede dieses Wasserstoffakzeptors gegenüber dem Methylenblau hin. Neben der schon erwähnten farbigen Reduktionsstufe (1) und deren Luftbeständigkeit (2) ist dies die Wasserunlöslichkeit (3) des Formazans, das also am Entstehungsorte ausfällt und liegen bleibt, und schließlich der Unterschied des Potentials (4), das beim TTC negativer als das des Mb ist. Der experimentelle Vorteil des TTC ist, daß es kein Vakuum benötigt, daß man also gegenüber der klassischen Thunberg-Methode von den Rohren, gegenüber unserer Exsikkatormethode von der Größe des Exsikkators unabhängig geworden ist. Auch hierbei ist das Waschen der Muskelstücke unerläßlich, was am besten in Eiswasser und so lange geschieht, bis die Muskelflocke weiß und makroskopisch blutfrei erscheint. Trotz sorgfältigsten Waschens muß durch mehrere Röhrchen die Donatorfreiheit dauernd kontrolliert werden. Ein weiterer Unterschied gegenüber der Reaktion mit dem Methylenblau besteht darin, daß nur der reagierende Dehydrasenträger (Muskel, Organ u. a.) rot wird, während die umgebende Flüssigkeit farblos bleibt, da das Formazan ja wasserunlöslich ist. Allerdings färbt sich die Lösung, wenn sie einige *Tage* im Brutschrank bleibt, leicht rosa an, was aber durch ubiquitäre Bakterien verursacht wird, auf die Kuhn besonders hingewiesen hat. Der Versuch gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen: In eine Mischung von TTC 1% und einem bestimmten H-Donator gibt man einen etwa 1 g schweren gewaschenen Dehydrasenträger (Muskel, Organ) von dem die Anwesenheit der zum Donator passenden Dehydrase bekannt ist. Zu diesem System gibt man in wachsenden Konzentrationen die zu prüfende Substanz, von der man den Verdacht hat, daß sie die Zellatmung am Dehydrasensystem hemmt. Bei der Hemmung bleibt die Lösung farblos, so wie auch die Organkontrolle sich nicht rot färbt, in der das gewaschene Organstück in einer reinen TTC-Lösung ohne Donator sich befindet. Die Tabelle 3 gibt über den Versuch im einzelnen Auskunft.

Tabelle 3.

	1	2	3	4
H-Donator	—	Bernsteinsäure	Glukose 1%	—
Dehydrase	gewaschener Muskel		gewaschene Leber	ungewaschener Muskel
H-Akzeptor	Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) 1% 1,0			
Ergebnis	weiß kein Donator	rot	rot	rot enthält H-Donator

Es ist versucht worden, die TTC-Bernsteinsäurereaktion zu einer histiochemischen Reaktion am unfixierten Gefrierschnitt auszubauen.

Dies gelang deshalb nicht, da der Gewebsschnitt zu dünn ist, um eine ins Auge fallende Reaktion zu zeigen und wohl auch zu geringe Mengen Dehydrasen enthält. Wenn man dagegen das Muskelstück, das in dem oben beschriebenen System sich rot angefärbt hat, auf dem Gefriermikrotom schneidet, so sieht man unter dem Mikroskop zackige rote Formazankristalle unregelmäßig im und über das Gewebe verteilt. Stellen wir diesen Gefrierschnitt jetzt ins Nadigemisch, so erscheinen nach der üblichen Zeit die zartblauen Indophenolgranula gleichmäßig über die Muskelfaser verteilt, dazwischen die Formazankristalle, die viel unregelmäßiger und auch größenordnungsmäßig verschiedener aussehen (vgl. Abb. 1). Es ist theoretisch auch gar nicht anders denkbar, da das TTC *den* Teil der Zellatmung für sich beansprucht, der den Wasserstoff vom Substrat bis höchstens an das Zytochrom b heranträgt, während die Nadireaktion gerade die andere Seite der Atmungskette benötigt, nämlich von der Zytochromoxydase bis zum Zytochrom b hin.

Literatur.

Ahlgreen, G.: Die Methylenblaumethode zum Studium der biologischen Oxydationen. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV/1. 1936. — Doerr, W.: S.ber. Heidelbg. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. (im Druck). — Graeff, S.: Frankf. Z. Path. **11**, 358 (1912). — Beitr. path. Anat. **70**, 1 (1922). — Zbl. Path. **32**, 337 (1922). — Die mikromorphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV/1, S. 93. 1936. — Kuhn, R., u. D. Jerschel: Ber. dtsch. chem. Ges. B **74**, 941, 949 (1941). — Über Triphenyltetrazoliumchlorid und verwandte biologische Reduktionsindikatoren. Vortrag im Kaiser-Wilhelm-Institut für med. Forschung. Heidelberg 22. Nov. 1948. — Schümmelfeder, N.: Verh. dtsch. Ges. Path. **1948**. — Thunberg, T.: Die Methodik der Dehydrogenasen. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV/2, S. 2295. 1933. — Erg. Enzymforsch. **7**, 169 (1939).

Dr. Volker Becker, Alzey (Rheinhessen), Kreuznacher Straße.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 115—133 (1949).

Aus der Augenklinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(damaliger Direktor: Prof. Dr. Fr. Poos).

Reizungskondition und Irritabilität (Pseudosensibilisierung) bei der pharmakologischen Beeinflussung von Einzelfunktionen der Organe.

(Nach experimentellen und klinischen Untersuchungsergebnissen am Auge.)

Von
Fritz Poos.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1948.)

Pharmakologische Reaktionsprüfungen werden am Auge bzw. an den autonom innervierten Muskeln des Irisdiaphragmas häufig angestellt, um aus dem Reizeffekt diagnostische Rückschlüsse zu ziehen auf allgemeine Tonusverhältnisse im Bereiche des vegetativen Nervensystems oder auf einseitige Störung der normalen Innervationsverhältnisse (Erregung oder Lähmung) bei unilateralen Krankheitsprozessen und bei Unterbrechung der Nervenbahn, wobei aus Besonderheiten des pharmakologischen Verhaltens auch die Erhebung einer topischen Diagnose für möglich gehalten wird, d. h. ob z. B. im Falle des Augensympathikus die zu einer teilweisen oder vollständigen Unterbrechung der Fasern führende Störung zentral im hypothalamo-spinalen Neuron (1. Neuron), im Zentrum cilio-spinale oder präganglionär (2. Neuron) oder im Ganglion cerv. supr. oder postganglionär (3. Neuron) zu lokalisieren ist. Bei diesen Prüfungen wurde auch dem Verhalten der Gefäße und der Akkommodation (Ziliarmuskel) Beachtung geschenkt.

Vor allem ist es die „épreuve des collyres" bei der Instillation von Tropfen und Tropfengemischen, mit welcher festgestellt werden soll, auf welcher Seite eine Innervationsstörung anzunehmen ist, d. h. im Falle einer Anisokorie, welche Pupille die normale ist, die engere oder die weitere. Trotz aller Schwierigkeiten und Fehlerquellen, die vor allem auch einer quantitativen Handhabung der Instillationsmethode anhaften, ist nicht zu bezweifeln, daß bei Funktionsstörungen des Augensympathikus und -parasympathikus die Reaktion der Pupille auf Adrenalin und Kokain als sympathisch erregende und parasympatisch hemmende, ferner auf die Gruppen der parasympathisch lähmenden und erregenden Gifte in aufschlußgebender Weise geändert wird.

Umgekehrt kann man aus der Reaktion der Pupille auf Wirkstoffe mit noch ungeklärten pharmakologischen Eigenschaften häufig ersehen,

ob das Agens einer und welcher der obengenannten Gruppen zuzuordnen ist. Wenn z. B. das Ergotamin, das vielfach als sympathikushemmendes Gift auftritt, nach Sympathikuslähmung am Kaninchen- und Menschenauge eine starke Mydriasis, ähnlich der „paradoxen Adrenalinmydriasis" zu erzeugen imstande ist (Poos und Santori, 1927, 1929), so müssen wir annehmen, daß bei bestimmten Organen und in gewissen Situationen eine sympathikuserregende Wirkung dieses Mittels ganz in den Vordergrund treten kann. Am Auge des Fleischfressers bewirkt Instillation von $^1/_2$%igem metansulfonsaurem Ergotamin eine spastische Miosis von physostigminähnlichem Charakter (W. R. Hess, 1925). Ferner wird beim Menschen durch subkonjunktivale Ergotamininjektion die Kokainwirkung auf den Ziliarmuskel vollständig unterdrückt, und es tritt auf dieser Seite ein Akkommodationskrampf für einige Stunden, ähnlich wie nach Physostigmin, auf (Poos, 1927).

Als Beispiel einer Pharmakoanalyse der spezifischen Wirkungen und des Angriffspunktes eines Wirkstoffes unter Zugrundelegung der Pupillenreaktionsbewegungen seien die von Brüggemann (1937) angestellten Proben mit dem von Knoll als Spasmolytikum empfohlenen Methyloctenylamin (Octin) mitgeteilt: Übereinstimmend erzeugte die Instillation der 10%igen Stammlösung in den Bindehautsack beim Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Menschen eine Pupillenerweiterungsbewegung, die nach ihrem zeitlichen Verlauf über 4—5 Stunden und wegen der nachweisbar bleibenden, wenn auch stark abgeschwächten Lichtreaktion auf dem Höhepunkt der Wirkung, als typisch spastisch-mydriatische Bewegung, d. h. durch Erregung des sympathischen Erweiterungsapparates zustande gekommen, angesehen werden muß. Nach vollständiger Lähmung der Parasympathikusnervenendigungen, bzw. des Sphincter iridis mit absoluter Pupillenstarre läßt sich die weite Pupille (Lähmungsmydriasis) durch Einträufeln von Octinum noch stärker erweitern (hinzutretende spastische Mydriasis). Dieses ist aber nur durch Sympathikusreizmittel möglich. — Auf dem Höhepunkt der mydriatischen Wirkung war beim Menschen keine Akkommodationslähmung nachweisbar, während eine durch Lähmung des Parasympathikus hervorgerufene Mydriasis immer von vollständiger Akkommodationslähmung begleitet wird. Das Octinum verhält sich bezüglich der Beeinflussung der Akkommodation aber wie andere Sympathikusreizmittel, z. B. Kokain und Adrenalin. — Nach Degeneration des Augensympathikus (Ganglionexstirpation) ist die mydriatische Wirkung des Octinum stark abgeschwächt. Bei einseitiger Sympathikuslähmung erweitern sich beim Kaninchen beide Pupillen; doch bleibt im Gegensatz zur paradoxen Erweiterung auf der gelähmten Seite durch Adrenalin, die Anisokorie bestehen. — Da nach Degeneration

der sympathischen Nervenendigungen ähnlich wie beim Kokain die mydriatische Wirkung des Octinums stark vermindert ist, darf angenommen werden, daß das Octinum am Auge an den sympathischen Nervenendigungen angreift bzw. seine ganze Wirksamkeit nur bei Gegenwart von Sympathikusstoff entfaltet.

Damit sind aber die Möglichkeiten, weitere Aufschlüsse zu bekommen, nicht erschöpft. Es bliebe noch zu prüfen, ob sich das Mittel auch nach Vorbehandlung mit unterschwelligen Adrenalindosen kokainähnlich verhält, d. h. eine auffallend verstärkte mydriatische Wirkung bei Gegenwart des Sympathikusstoffes zeigt und ferner, ob ähnlich wie durch Kokain bei zentraler Sympathikuslähmung, also erhaltenem Centrum ciliospinale eine überschießende paradoxe Mydriasis auf der miotischen Seite auftritt. Damit wäre das Mittel an der Pupille und Akkommodation ganz durchgeprüft und hätte dann eine Charakterisierung seiner Wirkungsweise auf das autonome Nervensystem bekommen, soweit sich diese aus dem Verhalten der normalen Pupille einerseits und nach Blockierungen (Ausschaltung des Parasympathikus, Unterbrechung des Sympathikus in verschiedenen Höhen) andererseits ergibt.

Haben wir die Absicht, mit der „épreuve des collyres" eine neurologische Diagnose zu stellen, z. B. herauszufinden, auf welcher Seite im Falle einer Anisokorie die Innervationsstörung liegt, so sind wir durch Vergleich der zeitlichen Verhältnisse für den Eintritt der ersten Reaktionsbewegung in der Lage, die unterschiedliche Grenzkonzentration (Wirkungsschwelle) zwischen rechts und links zu beobachten. Es ist nun von sehr großer pharmakodiagnostischer Bedeutung, im einzelnen Falle richtig zu erkennen, womit die unterschiedliche Empfindlichkeit des Organs ursächlich zusammenhängt. Wendet man von vornherein absichtlich sonst unwirksame, unterschwellige Dosen an, und tritt damit unter bestimmten Bedingungen eine Reaktion auf, so darf erst dann von Sensibilisierung, Empfindlichkeitssteigerung gesprochen werden, wenn eine solche wirklich vorliegt; vor allem muß ausgeschlossen sein, daß unter besonderen Bedingungen auf einer Seite veränderte Resorptions- und Permeabilitätsverhältnisse zu einer höheren Dosierung führen als auf der anderen Seite und ferner, daß keine „addition latente", d. h. keine Addition oder Subtraktion mit gleichzeitigen Reizen anderer Qualität am Organ zustande kommt.

Berücksichtigung des Permeabilitätsfaktors.

Da bei der Instillation von Wirkstoffen diese in erster Linie durch Diffusion die Hornhaut und durch die anteilsmäßige Resorption die Gefäßwand zu durchdringen haben, wird der Zustand der Hornhaut und der Gefäße für die effektive Dosis, die zum Erfolgsorgan gelangt,

von großer Bedeutung sein. Das intakte, gesunde Hornhautepithel setzt dem Eindringen der Stoffe den Hauptwiderstand entgegen. Aber selbst schon die geringsten Störungen des Flüssigkeitswechsels der Hornhautepithelzelle, z. B. nach Kontakt der Epithel-Schmerzrezeptoren mit einer sehr geringfügigen Kokainmenge erfolgt die Diffusion der Stoffe ins Hornhautparenchym und damit auch ins Kammerwasser wesentlich leichter. Beim Kaninchen zeigt die Hornhautoberfläche nach 1%igem Kokain schon sehr bald auch makroskopisch wahrnehmbare, reversible Eintrocknungserscheinungen durch Abdunstung bei mangelhaftem Flüssigkeitsersatz infolge Unterbrechung der normalen reflektorischen Tränenproduktion und Lidschlagfolge. Man wird also, wenn man gleichzeitig oder nacheinander mit pupillomotorisch „unterschwelligen" Kokain- und Adrenalindosen arbeitet, neben der „addition latente" mit einer höheren Effektivdosis zu rechnen haben, und zwar infolge der erleichterten Diffusion ins Auge hinein, die unter den gegebenen Bedingungen für alle bisher geprüften Substanzen maßgeblich ist. Man wird also die Frage, ob Adrenalin als Sympathikusstoff die Kokainwirkung am Erfolgsorgan sensibilisiert, mit anderen Worten, Kokain seine spezifische Wirkung auf die sympathische Nerv-Muskelzelle nur bei Gegenwart des Sympathikusstoffes entfalten kann und am Auge nur dann pupillomotorisch wirksam sein kann, wenn der Nervenapparat vom Zentrum ciliospinale einschließlich bis zum Erfolgsorgan intakt ist, nicht durch die direkte pharmakologische Methode am Auge, d. h. durch Prüfung der Funktionsempfindlichkeit des intakten Organs sicher entscheiden können.

Diese Schwierigkeiten kann man auch nicht umgehen, indem man Adrenalin in die Blutbahn injiziert. Die hierbei benutzten pupillomotorisch unterschwelligen Adrenalindosen sind zumeist nicht unterschwellig für die Muskelzelle, sondern nur unterschwellig für die Funktionen des intakten Organs, d. h. für die Pupille plus Lichttonus. Um so leichter wird es sich bei vorher, gleichzeitig oder nachher erfolgter Kokaininstillation um eine Addition handeln können. Aber es kommt bei dieser Versuchsanordnung noch ein weiteres gewichtiges Moment hinzu, und zwar die lokale (organspezifische) Dosisvariation im Auge bei intravenöser Applikation, infolge abweichenden Verhaltens der intraokularen Kapillarsysteme gegenüber den Systemen anderen Orts. Davon wird weiter unten die Rede sein.

Die Bedeutung des Permeabilitätsfaktors (Hornhautdiffusion) für die Effektivdosis nach Instillation wird sehr eindrucksvoll bei der Fazialislähmung. Auf der gelähmten Seite treten, infolge des paralytischen Lagophthalmus mit konsekutiver Hornhautepithelschädigung vorwiegend im unteren Abschnitt infolge des Verweilens der Flüssigkeiten im Bindehautsack bei dem gleichzeitig gestörten Tränenabfluß-

mechanismus alle instillierten Substanzen in wesentlich stärkerem Umfange in das Auge über als auf der normalen Seite (Poos, 1933). Die hierbei mit unterschwelliger Adrenalindosis 1:1000 erzeugbare Adrenalin-Mydriasis beweist also nichts für eine Änderung der Sympathikusfunktion bei Fazialislähmung, wie es von K. Löwy (1933) angenommen wurde.

Sehr ähnlich ist die Situation bei Basedowkranken mit Dalrympelschen und Stellwagschen Zeichen und Exophthalmus. An diesen Augen spricht nichts für einen erhöhten „Tonus des Augensympathikus" (Poos 1929). Die als Löwisches Zeichen von verschiedenen Autoren gelegentlich festgestellte „Adrenalinmydriasis" kommt sehr wahrscheinlich nur durch die Erhöhung der intraokularen Effektivdosis zustande, und zwar infolge der größeren Benetzungsfläche, den abnormen Verhältnissen der Lidfunktion und der zumeist vorhandenen Zustandsänderung des Hornhautepithels mit vermehrter Durchlässigkeit.

Bei den Diabeteskranken haben wir im Auge unter Umständen weitgehende Gefäßveränderungen mit sekundärer Alteration der Gewebe und unausbleiblicher Folge für den qualitativen und quantitativen Flüssigkeitswechsel in Rechnung zu setzen. Insbesondere ist es der verlangsamte Flüssigkeitswechsel im Auge, der zu höheren Effektivdosen führt. Deshalb sagt eine gelegentliche Adrenalinmydriasis beim Diabetes und auch die häufige Adrenalinmydriasis beim Glaukom mit seiner Neigung zu „Lymphostase" nichts aus über einen besonderen Funktionszustand des Sympathikus. Es können an dieser Stelle nicht alle Faktoren aufgeführt werden, die in einem so kompliziert organisierten und funktionierenden Organ wie das Auge zu Änderungen des Bedingungsmilieus führen, bei dem nach Instillation oder Injektion eine Erhöhung oder Erniedrigung der intraokularen Effektivdosis eintreten muß, die weder mit einer Änderung der Empfindlichkeit der Muskelzelle oder der funktionellen Organempfindlichkeit verwechselt werden darf. Ein die Änderung der Wirkungsbedingungen eines pharmakologischen Mittels am Erfolgsorgan allgemein herbeiführender Umstand, der im Auge und auch im Gehirn und Rückenmark bisher nicht gebührlich berücksichtigt wurde, halte ich einer ganz besonderen Hervorhebung für wert.

Bei bestimmten, vielfach schon von sehr niedrigen Konzentrationen an aufwärts, entfalten alle Wirkstoffe neben ihrer rein pharmakologischen Wirkung an der Muskelzelle wie an besonderen Rezeptoren (Steigerung oder Minderung der Zelltätigkeit in physiologischen Dimensionen) eine toxikologische Wirkung auf die Gefäßwandzelle („Kapillargiftwirkung" im eigentlichen Sinne) mit einer dekomponierenden Attacke auf das chemische Gefüge der Membran und des

protoplasmatischen Inhaltes, deren Reversibilität nicht nur an die Gifteliminierung gebunden ist, sondern von andersartigen, besonderen Reparations- und Restitutionsprozessen abhängig ist. Diese toxische, mit Permeabilitätserhöhung und deren Folgen einhergehende Wirkung kann die rein pharmakologische Wirkung nach Eliminierung des Wirkstoffes noch für lange Zeit überdauern, bis die reparativen Prozesse („Entzündungskomplex") wieder normale Funktionsverhältnisse in der peripherischen Strombahn hergestellt haben. Im allgemeinen tritt bei Anwendung der Wirkstoffe in vorwiegend „pharmakologischen Dosen" dieser toxische Gefäßfaktor milieuändernd weniger in den Vordergrund, und er ist im allgemeinen auch bald wieder neutralisiert, *ausgenommen sind hierbei aber das Auge, das Gehirn und das Rückenmark:* Bei diesen handelt es sich um geschlossene, mit Flüssigkeit gefüllte Hohlorgane, in denen eine Druckspannung von empirisch feststellbarer Normalhöhe herrscht. Unter den obwaltenden physikalischen Verhältnissen besteht bei der hohen Außenbelastung der blutabführenden Venen bzw. bei der Notwendigkeit, daß der Blutdruck in den Venen immer höher ist als der konstante Organbinnendruck, zwangsläufig ein kapillares Hochdrucksystem (Hydraulisierung), in dem unter normalen Verhältnissen sämtliche Kapillaren (im Gegensatz zu beweglichen und funktionell wechselnd beanspruchten Organen) dauernd eröffnet sein müssen, bei dem in sämtlichen Kapillarprovinzen ein annähernd gleicher Druck herrschen muß, in dem das Kaliber der Kapillaren zwangsläufig konstant ist bzw. kaum Schwankungen unterworfen ist und in dem daher der Grad der Semipermeabilität unter normalen Verhältnissen dauernd unverändert bleibt (siehe bei Poos, 1949, Kreislauftheorie).

Wenn man berücksichtigt, welche Kräfte, besonders im Auge, dritten Reizen gegenüber die Konstanz der erwähnten Faktoren zu erhalten bestrebt sind, so wird klar, daß die Reaktion auf Wirkstoffe und auch die Folgen entzündungserregender Noxen weitgehend durch die in solchen Druckräumen gegebenen statisch-dynamischen Kreislaufverhältnissen modifiziert werden. Intravenös gegebene hypertonische Neutralsalzlösungen greifen die Kapillarwand schädigend überall an; sie bewirken aber im Auge und Gehirn eine besonders starke Herabsetzung der Semipermeabilität mit Eiweißdurchtritt und Entzündung, da in diesen Systemen der hydrostatische Blutdruck in den zwangsläufig weit bleibenden, wandgeschädigten Kapillaren relativ hoch bleiben muß. Die Eiweißvermehrung in den Liquorflüssigkeiten ist leicht nachweisbar, und im Auge ist die „Entzündungsreaktion" auch im histologischen Präparat festzustellen. Die unter Umständen mehrere Tage anhaltende Erweichung von Auge und Gehirn hat mit osmotischer Wirkung nichts zu tun, sondern ist hierbei eine

Folge komplizierter Funktionsstörungen in der peripherischen Strombahn. Nachdem das Neutralsalz sehr bald ausgeschieden ist, können normale Druckverhältnisse erst wieder eintreten, nachdem eine Kette reparativer Prozesse die normalen Funktionen der Kapillaren wieder hergestellt hat (Poos 1932, 1935).

Aber auch nach Instillation von Wirkstoffen, besonders der Sympathikus- und Parasympathikus-Erregungsmittel in therapeutischen Dosen, ist ein relativ starker Übertritt von Eiweiß in die intraokulare Flüssigkeit nachweisbar. Immer wird die, wenn auch nur sehr geringfügig wandgeschädigte Hochdruckkapillare stark erweitert und verliert einen mehr oder weniger hohen Teil ihres Semipermeabilitätsgrades. Es ist daher einleuchtend, daß durch dieses zwangsläufige Verhalten der Kapillaren die pharmakologischen Wirkungsbedingungen in geschlossenen, unter Druckspannung stehenden Hohlorganen unter Umständen stark modifiziert sind. Bei der Beurteilung der hier ablaufenden Entzündungsprozesse und auch aller pharmakologischen Reaktionen müssen gerade diese für den physiologischen Hochdruckkreislauf spezifischen Verhältnisse mit in den Vordergrund unserer Betrachtungen gestellt werden.

Ziehen wir nun im nächsten Kapitel die Empfindlichkeit der intakten Organe in Betracht, so stoßen wir auf Unterschiede der Empfindlichkeit der Muskelzellen einerseits und der funktionellen Organempfindlichkeit andererseits, die nicht mit Änderung der Effektivdosis durch besondere Umstände zusammenhängen, sondern durch additive und subtraktive Wirkung von qualitativ unterschiedlichen, gleichzeitig wirkenden Reizen zustande kommen. Diese im ganzen Organismus anzutreffenden Beziehungen lassen sich besonders eindrucksvoll am Auge demonstrieren.

Addition und Subtraktion qualitativ unterschiedlicher Reize.

Am Sehorgan ist bei Anwendung von Grenzkonzentrationen die Addition einer pharmakologisch-mydriatischen Wirkung mit der retinogenen Erweiterungsspannung (Dunkelmydriasis) und in ähnlicher Weise die Addition einer pharmakologisch-miotischen Wirkung mit der retinogenen Verengerungsspannung (Hellmiosis) der Pupille möglich. Ferner kann aber im Bereiche der Grenzkonzentrationen die Erweiterungsspannung der Pupille eine pharmakologisch-miotische Wirkung und die Verengerungsspannung (Lichtreflex) die pharmakologisch-mydriatische Wirkung paralysieren („subtraction latente"). *Daraus ergeben sich z. B. im Falle der pharmakologisch-mydriatischen Wirkung des Adrenalins 2 Schwellenwerte, und zwar 1. die Dosis, welche die amaurotische Pupille erweitert und die sich auf die elementare Empfindlichkeit der Nerv-Muskelzelle bezieht und 2. die Dosis welche die*

helladaptierte Pupille erweitert und die den Lichtreflex zu überwinden hat. Diese letztere entspricht der funktionellen Reaktionsempfindlichkeit des ganzen intakten Organs. Diese Verhältnisse des mehrstufigen und konstellationsabhängigen Schwellenwertes besitzen Gültigkeit für alle intakten Organe, mit denen es die Pharmakologie zu tun hat, insbesondere auch für das Gefäßsystem, von dem weiter unten noch die Rede sein wird.

Auf Abb. 1 wird am rechten amaurotischen Auge die mydriatische Wirkung des sonst am intakten Organ unterschwelligen Adrenalins

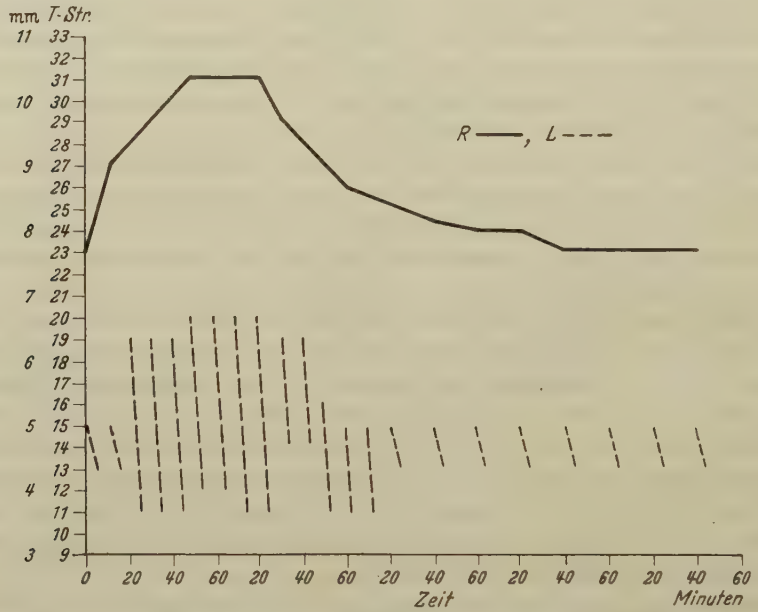


Abb. 1. Kaninchen. Dunkeladaptation. Ein Tropfen Adrenalin 1:1000 in beide Augen. *R* amaurotische Pupillenstarre. *L* normale Pupille.

1:1000 gezeigt. Am intakten linken Auge sieht man die Addition mit der Erweiterungsspannung im Dunkeln und Paralysierung der Wirkung durch den Lichtreflex im Zustande der Helladaptation. Die Tiere wurden im Dunkeln gehalten. Die Pupillenweiten wurden an einer Fernrohrskala auf Stativ mit Belichtungsvorrichtung gemessen. Im Augenblick der Belichtung war die Weite der Pupille (Kopfpunkte der gestrichelten Vertikalen) im Dunkeln ablesbar; danach wurde der Pupillendurchmesser nach einer Belichtungszeit von 5 Min. bestimmt (Fußpunkte der gestrichelten Vertikalen). Verbindet man die Kopfpunkte der Vertikalen zu einer Kurve, so wird die mydriatische Bewegung der Dunkelpupille durch Adrenalin 1:1000 erkennbar, während eine Verbindung der Fußpunkte zu erkennen gibt, daß dieselbe

Adrenalinwirkung an der Hellpupille latent bleibt. Bei der letzteren würde Adrenalin nur in höherer Konzentration eine mydriatische Bewegung erzeugen, d. h. also nach Überschreitung der zweiten Schwelle.

Als Parasympathikusreizmittel (Abb. 2) wurde Eserin in einer Verdünnung von 1:5000 gewählt, und zwar wurde beiderseits nur 1mal 1 Tropfen dieser Lösung instilliert. Diese Dosis ist sowohl an der amaurotisch-starren Pupille als auch an der Pupille des sehenden Auges im Zustande der Helladaptation (Verbindungslinie der Fußpunkte der Vertikalen) überschwellig. Dagegen wird eine miotische Wirkung dieser Grenzkonzentration durch die Erweiterungsspannung der Dunkelpupille des sehenden Auges (Verbindungslinie der Kopfpunkte der

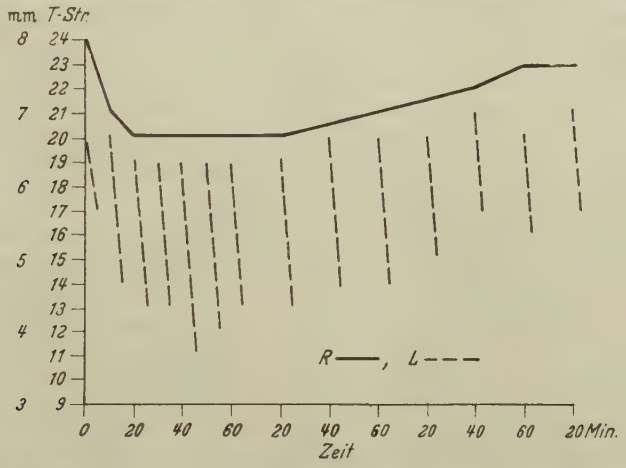


Abb. 2. Kaninchen. Dunkeladaptation. Ein Tropfen Eserin 1:5000 in beide Augen. *R* amaurot.sche Pupillenstarre. *L* normale Pupille.

Vertikalen) so gut wie vollständig paralysiert. Die Folge der Addition der miotischen Wirkung mit dem Lichtreflex und die Minderung bis Aufhebung der pharmakologischen Wirkung durch die Erweiterungsspannung im Dunkeln ist gleichzeitig eine abnorm große Bewegungsamplitude bei der Lichtreaktion.

Dieses Verhalten der Pupille gegenüber einem Miotikum in der entsprechend gewählten Grenzkonzentration sagt etwas Wesentliches aus über die Physiologie des normalen Lichtreflexes, und zwar kommt darin der pharmakologische Beweis für eine aktive pupillomotorische Wirkung der Dunkeladaptation zum Ausdruck. Würde die landläufige Meinung über die passive Erweiterung der Pupille bei Lichtreizminderung zu Recht bestehen, dann wäre eine teilweise oder vollständige Paralysierung der pharmakologisch-miotischen Wirkung im Zustande der Dunkeladaptation nicht möglich. Ähnlich wie wir für die Atmung eine zentrale reflektorische Steuerung der Exspiration und Inspiration

annehmen müssen, und bei der Thermoregulation die Reaktionen auf Kälteempfindung und Wärmeempfindung in gesonderten Reflexbahnen den Effektoren zugeleitet werden, so haben wir für das Ver-

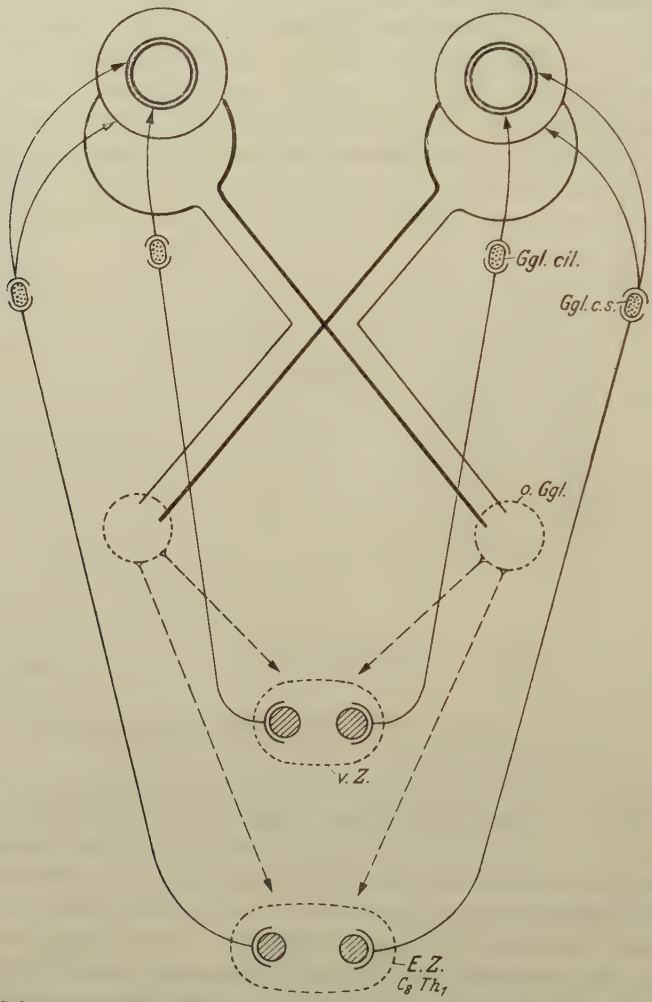


Abb. 3. Schema der doppelreflektorischen Lichtreaktion der Pupillen nach Poos. *E.Z.* Erweiterungszentrum im Halsmark (Centrum ciliospinale). *V.Z.* Verengerungszentrum (Sphinkterkerne). *O.Ggl.* Optikusganglien. *Ggl. c. s.* oberstes Halsganglion. *Ggl. cil.* Ziliarganglion.

ständnis der Pupillenbewegungen, für die quantitative Regulierung des Lichteinfalles (Lichtreaktion) einen Doppelreflex zugrunde zu legen.

Während wir nach Verlust der Augen, d. h. der Netzhäute oder bei deren vollständiger Blockierung den „Eindruck" des weder Hellen

noch des Dunklen haben, vergleichbar mit dem „Eindruck", den wir hinter unserem Kopfe („extracampin") haben, vermitteln uns die mit einem Lichtreiz in der Netzhaut verbundenen chemisch-dissimilativen Vorgänge die Empfindung des Hellen und die mit einer Lichtreizminderung oder dem Fehlen des Lichtreizes verknüpften chemisch-assimilativen Vorgänge in der Netzhaut die Empfindung des Dunkleren bzw. Schwarzen. Beide Aktionen verlaufen in der Netzhaut entsprechend der stetigen Grauskala zwischen Weiß und Schwarz, Hell und Dunkel ständig nebeneinander her. Der erstgenannte Vorgang der Dissimilation von Sehsubstanz ist der energetische Ausgangspunkt für einen Reflexbogen, der zur aktiven Pupillenverengerung führt (via Sphinkterkern über den Parasympathikus), während der zweitgenannte Vorgang der Assimilation von Sehsubstanz der energetische Ausgangspunkt für einen Reflexbogen ist, der zur aktiven Pupillenerweiterung führt (via Sympathikus über des Zentrum ciliospinale und Ganglion cerv. supr.). Auf Abb. 3 ist der der Lichtreaktion zugrunde liegende Zwiereflex schematisch zur Darstellung gebracht.

Im Hinblick auf die anatomischen Einrichtungen des Irisdiaphragmas als mobile Blende wird die tatsächliche Funktionsweise des peripherischen Pupillarmechanismus nur verständlich unter Zugrundelegung einer parasympathisch-födernden und sympathisch-hemmenden, hinlänglich bewiesenen Doppelinnervation des Sphinkters als den eigentlichen Motor für die Pupillenbewegungen (Poos 1926, 1927).

Von großer Bedeutung für das Verständnis der simultan-polaren Vorgänge bei der Lichtreaktion ist die Erscheinung der sog. physiologischen Pupillenweite. Wir verstehen darunter die Einstellung und Aufrechterhaltung immer der gleichen mittleren Pupillenweite von 3—4 mm Durchmesser bei allen Graden der Außenhelligkeit zwischen 100 und 1100 lux, vorausgesetzt, daß die Änderung der Außenbeleuchtung langsam und stetig verläuft (z. B. Kommen des Tages oder Eintritt der Dämmerung), oder aber nach plötzlicher Änderung, wenn der neue Helligkeitsgrad für längere Zeit konstant bleibt. Die Zeit, die vergeht, bis die dissimilatorischen und assimilatorischen Vorgänge in der Netzhaut sich in ihr neues Gleichgewicht gebracht haben, entspricht der Netzhautadaptation und gleichzeitig auch der pupillomotorischen Adaptation mit der Wiedereinstellung der physiologischen Pupillenweite (Indifferenzzustand in Analogie zu den Verhältnissen beim Temperatursinn). Eine plötzliche, aber nur vorübergehende Änderung der Pupillenweite tritt nur in Erscheinung bei plötzlicher Änderung der Außenbeleuchtung. Hierbei ist das absolute Maß der objektiven Helligkeit nicht maßgebend dafür, ob die Pupille sich anfänglich verengt oder erweitert, sondern der vorbestehende Adaptationszustand der Netzhaut. Es kann also z. B. bei 500 lux eine

reflektorische Verengerung oder eine reflektorische Erweiterung der Pupille erzeugt werden, je nachdem man von einer vorher dunkleren oder helleren Beleuchtung auf 500 lux einstellt. Es ist also, ähnlich wie beim Temperatursinn, das Wirkungsgefälle und die Richtung dieses Wirkungsgefälles für den Reflexerfolg entscheidend. Alle diese Erscheinungen wären nicht möglich bei einseitig-parasympathischer Steuerung des Sphinkters mit passiver Erweiterung bei Lichtreizminderung, sondern sie werden nur verständlich auf Grund der Zwiereflexnatur der Lichtreaktion mit aktiver Erweiterung der Pupille unter der Herrschaft der in der Netzhaut immer gleichzeitig ablaufenden assimilativen Dunkelvorgänge. Diese letzteren gelangen dauernd vorwiegend bzw. ausschließlich zur Wirkung bei einer Außenbeleuchtung unter 100 lux bzw. bei Ausschluß jeglichen Lichtreizes (Zunahme der Dunkelmydriasis entsprechend der Zunahme der Dunkeladaptation, aktive Erweiterungsspannung, via Reflexbogen über den Sympathikus), während bei einer Außenbeleuchtung über 1100 lux die dissimilatorischen Netzhautvorgänge dauernd überwiegen oder ausschließlich wirksam bleiben, so daß die Pupille dauernd entsprechend verengt bleibt. Es ist also an die Außenhelligkeiten jenseits von 100 und 1100 lux eine pupillomotorische Adaptation mit Erreichung eines Indifferenzzustandes (physiologische Pupillenweite) nicht möglich.

Für das Verständnis der pharmakologischen Reaktionen der Pupille des nicht-amaurotischen Auges war diese Exkursion auf das sinnesphysiologische Gebiet notwendig. Zum Beispiel führt eine Unterbrechung des Verengerungsreflexbogens, gleichgültig an welcher Stelle, zu einer Mydriasis, die wir klinisch mit absoluter Pupillenstarre bezeichnen. Faktisch handelt es sich hierbei nur um eine reflektorische Verengerungsstarre, die auch im peripherischen Ende des Reflexbogens bei Unterbrechung der postganglionären parasympathischen Nervenfasern für den Sphinkter durch Atropin oder Skopolamin entsteht. Die aktive Erweiterung der „absolut starren" Pupille wird erzeugt und dauernd unterhalten durch Impulse, die dauernd von der Netzhaut aus im Erweiterungsreflexbogen über den Sympathikus verlaufen, und im Sphinkter die aktive Erschlaffung (Minderung auch des automatischen Tonus) erzeugen und gleichzeitig den Dilatator erregen. Solange die Unterbrechung durch Atropin wirksam ist, die reflektorische Verengerungsstarre also fortbesteht, resultiert bei Intaktheit des sympathischen Erweiterungsreflexbogens eine *aktive Erweiterungsspannung*. Der Sphinkter kann von sich aus die Pupille gar nicht erweitern. Erreichen ihn die zentralen Impulse zur Verengerung nicht mehr, so sind keine reflektorischen Bewegungen mehr möglich. Ihrem Wesen nach ist also die immobile Mydriasis nach

Unterbrechung des Verengerungsreflexbogens (auch durch Atropin!) eine aktive, effektiv pupillostatische, d. h. lichtstarre Erweiterungsspannung (= Verengerungsstarre).

Diese Zusammenhänge werden des weiteren klar bei Betrachtung der gegensinnigen Verhältnisse bei der Erweiterungsstarre der Pupille. Eine solche ist nur möglich durch Unterbrechung des Erweiterungsreflexbogens, z. B. an irgendeiner Stelle der Augensympathikusbahn. Die Folge ist weniger eine „Lähmung" des Dilatators, der ja weiterhin automatisch funktioniert und auf Adrenalin und auch Kokain im Falle einer zentralen Unterbrechung (siehe unten) anspricht, sondern der Verlust der von der Netzhaut kommenden und über die zentralen Stationen geleiteten aktiven Erweiterungsimpulse, die eine Erschlaffung des Sphinkters und aktive (nicht automatische) Verkürzung des Dilatators bedingen. Die Erweiterung des nur noch parasympathisch innervierten Sphinkterringes erfolgt reflektorisch bei Lichtreizminderung nur noch unzulänglich und „passiv" durch die Automatie der Dilatatormuskelplatte, also nur etwas über mittelweit. Infolgedessen bleibt auch die Atropinmydriasis entsprechend unzulänglich, da jegliche aktive Erweiterungsspannung entfällt. Die Sympathikuslähmung der Pupille ist ihrem eigentlichen Wesen nach also eine Sperre der aktiven Erweiterungsspannung. Bei dieser „reflektorischen Erweiterungsstarre" bleibt die Pupille in erweiterungsbeschränktem Umfange lichtreflektorisch mobil, da eine einseitige Steuerung des Sphinkters via Parasympathikus bestehen bleibt. Diese Erweiterungsreflexstarre wird aber auch dem Wortsinne nach manifest bei Ausschaltung des Lichtreizes (Dunkelmydriasis) oder Unterbrechung im Verengerungsreflexbogen, z. B. durch Atropin. Daraus resultiert bei einseitiger Sympathikuslähmung die Anisokorie im Tageslicht und die pupillostatische Fixierung dieser Anisokorie z. B. bei völliger Dunkelheit oder nach doppelseitiger Atopinisierung.

Zieht man in Betracht, daß die muskulären und nervösen Einrichtungen für das Irisdiaphragma als Blende ausschließlich im Dienste der Regulierung des Lichteinfalles stehen und die Impulse für den aktiven Verengerungs- und aktiven Erweiterungsreflex ausschließlich in der Netzhaut entstehen, so darf man den Zentralstationen, die die Reflexbögen entsprechend den Neuronenketten durchlaufen, keine allzu große Bedeutung für die Pupillomotorik zusprechen, insbesondere diese nicht als „vegetative Zentren" auffassen, die direkt oder nach „propriozeptiven Wechselwirkungen" von sich aus das reflektorische Geschehen beeinflussen und die Pupillenweite bestimmen. Es gibt keinen „Sympathikotonus" oder „Parasympathikotonus" an der Pupille im Sinne einer vegetativen Stimmungslage, die ihren Ausdruck an der Weite der Pupille fände. Jedenfalls ist hierfür noch kein Beweis

erbracht worden, und die bisherigen vermeintlichen Beweise sprechen bei kritischer Betrachtung dagegen (Poos 1939).

Registriert man die konstante Weite der absolut autonomisierten Pupille, d. h. nach vollständiger Ausschaltung des lichtreflektorischen Geschehens (amaurotische Starre) über 2mal 24 Stunden und länger, so wird eine vegetativ-bedingte Schwankung zu keinem Zeitpunkt und nicht um den kleinsten Bruchteil eines Millimeters nachweisbar sein (Poos und Grosse-Schönepauck 1936). Auf Abb. 4 ist ein solcher Versuch zur Darstellung gebracht.

Ferner hat die Schlafmiosis nicht das geringste mit „Parasympathikotonie" während des Schlafes zu tun, sondern sie ist ihrem Wesen nach

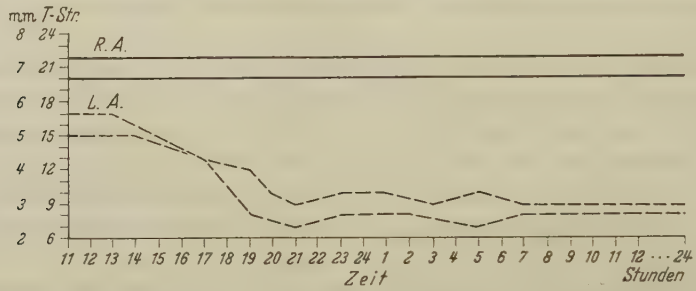


Abb. 4. Kaninchen. Spontanes Verhalten der Pupillen über 48 Stunden bei 2 Tieren. Konstante Außenbeleuchtung durch Batteriestrom. R. Augen ———— amaurotisch-starre Pupillen. L. Augen — — — — normale Pupillen.

eine Akkommodationsmiosis, die nicht einmal unmittelbar von der parasympathischen Innervation abhängig ist (Poos, 1949). — Ferner kann die gelegentlich erzeugbare Adrenalinmydriasis bei Basedow, Diabetes, Glaukom usw. nicht als Ausdruck eines allgemein erhöhten Sympathikotonus hingenommen werden, sondern diese hat ebenso ihre besonderen Gründe wie die Adrenalinmydriasis bei der Fazialislähmung (siehe oben).

Es gibt nur eine Ausnahme, bei der eine Erregung innervationsmäßig in die physiologischerweise nur lichtreflektorisch erfolgende Steuerung der Pupillenweite eingreift, das ist die ganz andersartig bedingte, bezogen auf den Sehakt dysteleologische, vorübergehende aktive Erweiterungsschwankung der Pupille als *Mitinnervation* des Augensympathikus bei plötzlichen Affekten, allgemeinen Erregungs- und Angstzuständen, steilkurvigen Lust- und Unlustempfindungen, akuten Schmerzattacken. In der Mikroform gehört auch die Beeinflussung der oszillierenden „Pupillenatmung" ohne Änderung der statischen Pupillenweite durch das Aufmerken und durch psychische Vorgänge hierher. Die vorübergehende Schreck- und Schmerzmydriasis ist aber ähnlich wie die Darmerregung, Blässe bis zur Ohnmacht

nur der Ausdruck einer allgemeinen dysteleologischen Reaktion des gesamten Sympathikus auf diese unphysiologischen Reize.

Insbesondere aber sind die vorgetragenen sinnesphysiologischen Zusammenhänge von Bedeutung für die in dieser Abhandlung angeschnittenen Probleme bezüglich der Wirkung von Grenzkonzentrationen, der Schwellenwerte und der einfachen Empfindlichkeit der Muskelzelle einerseits und der funktionellen Empfindlichkeit des intakten Organs andererseits. Daß uns hierbei nur die Beachtung der sinnesphysiologischen Tatsachen dem Ziele näher führen kann, soll im folgenden an der hierfür sehr instruktiven Erscheinung der „paradoxen Adrenalinmydriasis" bei Sympathikuslähmung demonstriert werden. Wir befinden uns dabei sehr wahrscheinlich auch deshalb auf dem richtigen Wege, da gleichzeitig auch die beim Menschen bei zentraler Sympathikuslähmung beobachtete Kokainmydriasis (Förster und Gagel, P. Wormser) verständlich wird. Bezüglich der vollständigen Literatur über die bisherigen Auffassungen der Zusammenhänge bei diesen paradoxen Wirkungen verweise ich auf die unlängst erschienene große Monographie von P. Wormser-Zürich; „Die Erweiterungsreaktionen der Pupille nach Unterbrechung der sympathischen Innervation" (Bibliotheca ophthalmologica, S. Karger, 1948). Meine in dieser Monographie zitierten früheren Untersuchungsergebnisse und Schlußfolgerungen erfahren durch die folgenden Ausführungen eine wesentliche Vervollständigung.

Bei einseitiger, rechtsseitiger Sympathikuslähmung (s. Abb. 5) tritt bei Tagesadaptation auf der linken normalen Seite nach Instillation von Adrenalin 1:1000 keine Pupillenerweiterung auf, da der Lichtreflex die geringfügige pharmakologische Erweiterungsspannung überwinden kann, um die physiologische Pupillenweite aufrechtzuerhalten. Der Lichtreflex sendet stärkere Impulse, sobald die Pupille unter dem Einflusse des Adrenalins beginnt, sich zu erweitern, wodurch Netzhautblendung eintreten würde. Bei stark herabgesetzter Außenbeleuchtung wird aber die im Hellen latent bleibende Mydriasis sofort manifest (Abb. 1).

Ganz anders liegen die Verhältnisse auf der miotischen sympathikusgelähmten Seite. Hier vermag Adrenalin 1:1000 nach Instillation die Pupille entsprechend der elementaren Nerv-Muskelempfindlichkeit (1. Schwelle) prompt zu erweitern, da bei der gleichen Außenbeleuchtung wie für das linke Auge auf der miotischen Seite eine die pharmakologische Wirkung hemmende Gegenwirkung des Lichtreflexes erst eintritt, wenn die mydriatische Bewegung zu einer Überschreitung der mittleren, physiologischen Pupillenweite geführt hat (2. Schwelle entsprechend der funktionellen Organempfindlichkeit). Es ist also vollständig gleichgültig, ob der Lichtreflex als solcher zerstört ist

(Amaurose), ob er das Erfolgsorgan nicht mehr erreicht (Reflexstarren, z. B. Pupillotonie), oder ob er, wie bei der Lähmungsmiosis durch Sympathikuslähmung sich erst bei künstlicher Erweiterung dieser Pupille bis über die mittlere Weite geltend macht; der Effekt ist immer derselbe: der Lichtreflex tritt nicht als Gegenwirkung auf bei einer pharmakologisch-mydriatischen Bewegung, weshalb mit einer kleineren Wirkungsdosis auszukommen ist. Die Lähmungsmiosis bedeutet ein

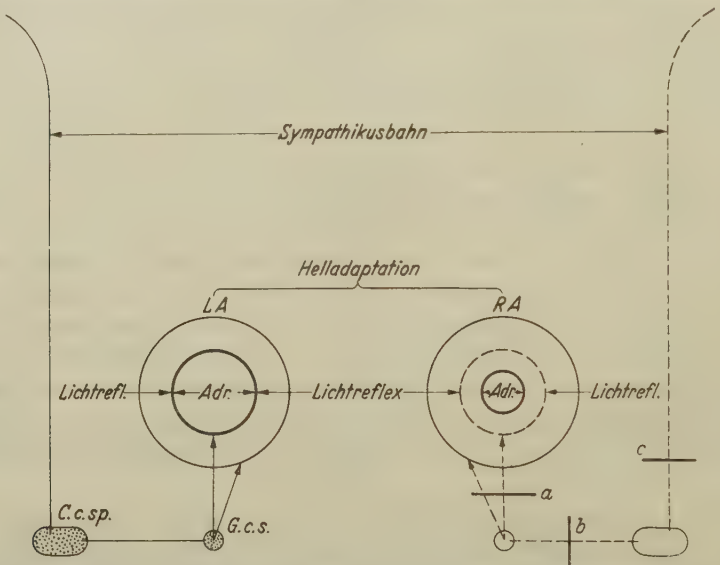


Abb. 5. Schema für die „paradoxe Adrenalin-(und Kokain)-Mydriasis". *LA.* normal. 3-Neuronen-Kette der Augensympathikusbahn. *C.c.sp.* Zentrum Ziliospinale im Halsmark. *G.c.s.* oberstes Halsganglion. Sympathikusinnervation des Sphinkters und Dilatators. — *RA* Sympathikuslähmung. Unterbrechung in verschiedenen Höhen, *a* postganglionär, *b* präganglionär, *c* zentral.

Mißverhältnis zwischen Pupillenweite und dem Grade der Außenbeleuchtung. Die Erweiterungsbewegung der Pupille durch Grenzkonzentrationen entsprechend der 1. Schwelle findet am Lichtreflex erst Widerstand, wenn „Netzhautblendung" eintritt. Deshalb läßt sich auch eine Atropindosis finden, die bei Helladaptation nur die miotische, sympathikusgelähmte Seite erweitert (POOS und SANTORI, 1929).

Die Überschreitung der 2. Wirkungsschwelle (Überwindung des Lichtreflexes) kommt zustande, da der Permeabilitätsfaktor auf der Seite der Sympathikuslähmung zu einer höheren Effektivdosis von Adrenalin am Erfolgsorgan führt (STRAUB, POOS u. a.).

Im Gegensatz zu der Wirkung der Vertreter der Atropingruppe kann sich bei Erweiterung beider Pupillen die Anisokorie nur umkehren

durch die Wirkung der spastischen Mydriatika. Dieses ist im Falle des Adrenalins verständlich, da diese Substanz als Sympathikusstoff die Innervation zu ersetzen imstande ist. Beim Kokain hängt diese Wirkung von den Innervationsverhältnissen ab. Nach Degeneration der sympathischen Nervenendigungen wird Kokain nicht unwirksam, aber deutlich schwächer wirksam als auf der normalen Seite. Bei Unterbrechung der Sympathikusbahn zentral vom ziliospinalen Zentrum im Halsmark wird auch die Pupille eng (Abb. 5). Kokain vermag aber unter diesen Verhältnissen die miotische Seite prompt und stark zu erweitern, da die prä- und postganglionären Nervenfasern einschließlich des Zentrums im Halsmark (Sympathikusstoffbildung) erhalten sind (Förster und Gagel, P. Wormser). Es ließe sich in solchen Fällen zweifellos auch eine Dosis finden, bei welcher das Kokain entsprechend der 1. Empfindlichkeitsschwelle die Pupille nur auf der zentral-sympathikusgelähmten, miotischen Seite erweitert („paradoxe Kokainmydriasis"). Die Umkehrung der Ausgangsanisokorie ist hierbei wiederum durch den Permeabilitätsfaktor, d. h. durch die höhere Effektivdosis bestimmt.

Mit der handelsüblichen Konzentration des Adrenalins 1:1000 wenden wir bei der Instillation eine solche Dosis an, die auf der miotischen, sympathikusgelähmten Seite deshalb zur Erweiterung führt, weil diese Dosis die Wirkungsschwelle für die Muskelzelle überschreitet. Auf der normalen Seite bleibt die gleiche Dosis aber wirkungslos, weil sie die 2. Wirkungsschwelle für die funktionelle Organempfindlichkeit (Überwindung des Lichtreflexes) nicht erreicht.

Wir werden ähnlichen Zusammenhängen auch bei anderen intakten oder nach bestimmten Eingriffen oder Krankheitsprozessen nicht mehr normal funktionierenden Organen begegnen. Als weiteres Beispiel sei kurz auf die Verhältnisse beim Gefäßsystem hingewiesen. Der Tonus der Gefäßmuskeln und der Kapillaren wird entsprechend den wechselnden Anforderungen von zentral- und peripherischnervösen Impulsen, durch gewebshumorale Einwirkungen, durch Blutdynamik, Blutchemismus, Temperatur usw. in komplizierter und nicht selten in fortdauernd energischer Weise dirigiert. Die funktionelle Organempfindlichkeit gegenüber Gefäßmitteln, die hier eingreifen, wird natürlich infolge der Addition und Subtraktion qualitativ unterschiedlicher Reize eine ganz andere sein wie nach Ausschaltung von zunächst nur einem der Tonusdirigenten, z. B. der Vasokonstriktoren. Bekanntlich resultiert nach Sympathikuslähmung eine Automatie mit großer Labilität der Reizbeantwortung, vor allem in den entsprechenden Kapillargebieten. Prüft man weiterhin das Verhalten des denervierten, ausgebluteten und mit Ringerlösung durchspülten Gefäß*präparates*, so stellt sich eine um das Vielfache gesteigerte Bereitwilligkeit zur

Reizbeantwortung, jedenfalls für die Vasokonstriktion, heraus. Wir haben es nicht mehr mit dem intakten Organ in seinem physiologischen Bedingungsmilieu zu tun, sondern jetzt sind die Reaktionen nur noch Ausdruck der elementaren Empfindlichkeit der Muskelzelle (wie bei der denervierten und dem Einfluß der Lichtreaktionen entzogenen Pupille).

Wie energisch das Gefäßsystem als intaktes Organ mit seinen eigenwilligen Funktionen auch eine massive lokale Adrenalinwirkung aufzuheben imstande ist, demonstriert die Überwindung der anämisierenden Konstriktion nach subkutaner Adrenalininjektion durch den Thermoreflex. Andererseits ist die erstaunliche weitgehende Herabsetzung der Wirkungsschwelle des Adrenalins im nicht mehr organischen Läwen-Trendelenburgschen Gefäßpräparat eine durchaus natürliche und verständliche Erscheinung, die nichts mit neuen Eigenschaften des Erfolgsorgans, also nichts mit „Sensibilisierung" des Organteiles oder der Nerv-Muskelzelle zu tun hat. Geändert sind nur die Bedingungen, die es ermöglichen, daß die immer gleichbleibende, physiologische, elementare Reaktionsbereitschaft der Muskelzelle ungehindert durch andere gegensinnige, funktionelle Direktiven von seiten des intakten Organs in der Reaktion des „Präparates" zum Ausdruck kommt.

Wir sind also nicht gezwungen, in den gewählten Beispielen der Pupille und des Gefäßorgans nach Denervierung und Ausschaltung starker Reizfaktoren wie den Lichtreflex oder den Blutfaktor für das Gefäßpräparat eine qualitative, substantielle oder funktionelle Eigenschaftsänderung des Erfolgsorgans anzunehmen, sondern können das quantitativ veränderte Verhalten in hinlänglicher Weise durch die grundsätzliche Änderung der Reizbedingungen verstehen.

Ganz allgemein betrachtet haben wir zu unterscheiden eine *Reizzunahme* und *Reizabnahme,* stetig, bei gleichbleibender Qualität; eine *Reizsummation,* wobei der Effekt abhängig ist von der Frequenz von Einzelreizen gleichbleibender Qualität; eine *Reizungsaddition,* wobei der Effekt abhängig ist von der additiven Wirkung gleichzeitiger Reize verschiedener Qualität und schließlich eine *Reizungssubtraktion,* wobei der Effekt abhängig ist von der subtrahierenden (hemmenden oder paralysierenden) Wirkung gleichzeitiger Reize verschiedener Qualität.

Nicht die Irritabilität ändert sich, sondern diese tritt nur einem bestimmten Reize gegenüber in reiner Form, d. h. uneingeschränkt durch andere, funktionelle, organbedingte Reizkonditionen in Erscheinung. Nur in diesem Sinne darf von Sensibilisierung gesprochen werden; besser ist aber immer, die Unterscheidung zu suchen zwischen der elementaren Empfindlichkeit der Muskelzelle (als Organelement) und der funktionellen Organempfindlichkeit, für die aus plausiblen Gründen die Reizschwellen unter Umständen sehr weit auseinander liegen.

Literatur.

Brüggemann, E.: Zur Pharmakologie des Octinums. Inaug.-Diss. Münster i. W. 1937. — Förster, O., u. O. Gagel: Z. Neur. 88., (1932). — Förster, O., O. Gagel u. W. Mahoney: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 98 (1936). — Hess, W. R.: Klin. Mbl. Augenhk. 75, 295 (1925). — Löwy, K.: Mschr. Ohrenhk. 67, 480 (1933). Poos, Fr.: Klin. Mbl. Augenhk. 77, 5 (1926); 80, 749 (1928); 89, 145 (1932); 91, 346 (1933). — Arch. exper. Path. (D.) 126, 307 (1927). — Atti del Congr. Oftalm. Roma 1927. — Graefes Arch. 127, 489 (1931); 134, 268 (1935). — Mschr. Ohrenhk. 67, 1053 (1933). — Arch. Augenhk. 109, 162 (1935). — Erg. Physiol. usw. 41, 882 (1939). — Arch. Psychiatr. u. Neurol. 1949 (im Erscheinen begr.) — Kreislauftheorie. Arch. f. Kreislaufforschung 1949 (im Erscheinen begr.) — Poos, Fr., u. H. Grosse-Schönepauck: Graefes Arch. 135, 144 (1936). — Poos, Fr., u. G. Santori: Graefes Arch. 121, 443 (1929). — Straub, H.: Pflügers Arch. 134, 15 (1910). — Wormser, P.: Die Reaktion der Pupille auf Mydriatica nach Unterbrechung der sympathischen Pupillenbahn. Bibliotheca ophthalmologica. Basel: S. Karger 1948.

Prof. Dr. Fr. Poos, Düsseldorf-Oberkassel, Luegallee 14.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 134—137 (1949).

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M.

Zur Frage der Leberschädigung durch Chemotherapeutika.

Von

Heinz Schaefer.

(Eingegangen am 30. Dezember 1948.)

Die großen Erfolge, die man mit Salvarsan, Atebrin und weiteren Chemotherapeutika zu verzeichnen hatte, ließen unangenehme Wirkungen, welche die beabsichtigte begleiteten, in den Hintergrund treten. Hinweise auf die sich — nach Verwendung der im Kampfe gegen eine bestimmte Krankheit spezifisch wirkenden, so geschätzten Pharmaka — einstellenden Schäden konnten ihren Siegeslauf nicht aufhalten. Seit einiger Zeit mehren sich aber die Stimmen, die eine Berücksichtigung der unerwünschten sog. Nebenwirkungen für notwendig erklären (z. B. Fest[1], Peters[24]).

Schon lange ist das Auftreten eines Ikterus im Anschluß an eine Salvarsanapplikation bekannt (Neisser[2]), so daß man von einem Salvarsanikterus (Rehder und Beckmann[3]) gesprochen hat. Ohne die umfangreiche über den Salvarsanikterus vorliegende Literatur durch eine weitere Veröffentlichung vermehren zu wollen, seien im folgenden kurz die für die Pathogenese dieses Ikterus zur Zeit diskutierten Möglichkeiten schematisch angeführt:

A. Salvarsan ist ursächlich an der Ausbildung des Ikterus beteiligt.

1. Es handelt sich bei ihm um eine direkte [a) und b)] oder indirekte [c)] schädliche Folge der Salvarsanapplikation auf die Leber.

a) Durch toxische Wirkung des Salvarsans entsteht eine Leberschädigung (Mussgnug[4]).

b) Durch Überempfindlichkeit tritt ein Ikterus im Sinne einer Jarisch-Herxheimerschen Reaktion auf (Winkler[5], Zieler[6] und von Herff[7], beide zitiert nach Osterwald[8]).

c) Die (durch den auf Salvarsan hervorgerufenen Zerfall der Spirochäten) gebildeten Giftstoffe schädigen die Leber und rufen einen Ikterus hervor (Winkler[9]).

2. Salvarsan hat nur sekundäre Bedeutung bei der Pathogenese des Ikterus.

a) Das Salvarsan führt nur zur Manifestation eines primär durch Lues bedingten Leberschadens, so daß der Ikterus als „syphilotoxischer" (Buschke[10], zitiert nach Winkler[5]) anzusprechen ist.

b) Die Leber wird bei gleichzeitiger Salvarsanbehandlung leichter durch zusätzliche Schädlichkeiten verändert als eine normale (Eppinger[11], zitiert nach Jahn[12]). Zum Beispiel wird durch Salvarsan nur die Empfindlichkeit gegenüber der Hepatitis epidemica erhöht (Ruge[13], zitiert nach Osterwald[8]).

c) Dem Salvarsan kommt nur sekundäre Bedeutung zu, nämlich durch die Anbahnung einer Krankheitsbereitschaft infolge einer primär toxischen Leberschädigung oder einer funktionellen Leberschwächung (Störmer[14]), d. h., daß

Salvarsan nur einen Ikterus (als Zweitschädigung) nach vorangegangener anikterischer Leberschädigung auslöst (Holler[15] und Silbergleit und Föckler[16], beide zitiert nach Osterwald[8]).

B. Der Ikterus steht in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit Salvarsan.

1. Es handelt sich um ein durch die am Leben gebliebenen und erneut sich vermehrenden Spirochäten hervorgerufenes Monorezidiv, das auch ohne Salvarsan aufgetreten wäre (Winkler[5]).

2. Eine Hepatitis epidemica wird fälschlicherweise für einen Salvarsanikterus gehalten (Winkler[9], auch Jahn[12]).

3. Der Ikterus ist — ebenso wie bei 2. — weder auf Salvarsan noch auf Lues zurückzuführen, sondern auf die Übertragung eines Virus in nicht genügend sterilisierten Spritzen.

a) In der Spritze war noch Virus einer an Hepatitis epidemica erkrankten Person enthalten, das bei der Salvarsaninjektion auf den Patienten übertragen wurde (Inkubationszeit 14—43 Tage) (Hörstebrock[17]). — Würde mit B. 2. zusammenfallen.

b) Es wurde mit der Spritze ein anderes ikterogenes Virus übertragen, da die vorher behandelten Personen nicht an Hepatitis epidemica erkrankt gewesen sein sollen (Inkubationszeit 70—140 Tage. Virus nur durch Blut von Mensch zu Mensch übertragbar). „Homologer Serumikterus" (Bigger[18], MacCallum[19], Hörstebrock[17]).

Für die beiden letzten Annahmen spricht, daß nach gründlicher Sterilisation eine Ikterusübertragung vermieden wird, gegen sie, daß bei der Injektion anderer Substanzen — und erst recht bei Bluttransfusionen — nicht ebenfalls häufig ein Ikterus auftritt. (Siehe hierzu das Referat von Stuhlfauth[20] über die Arbeit von Hörstebrock[17]).

Wäre es möglich, in einer Versuchsanordnung unabhängig von Lues und unter Ausschaltung der Übertragung eines Virus mittels Salvarsan einen Leberschaden zu erzeugen und nachzuweisen, so käme einem derartigen Verfahren eine besondere Bedeutung in der Frage der Pathogenese des „Salvarsanikterus" zu. Felix und Schaefer[21] haben nun in Versuchen mit Rattenlebersuspensionen in vitro gezeigt, daß Neosalvarsan die Leber schädigt. Sie schlossen das daraus, weil Neosalvarsan die Fähigkeit der Leber zum Abbau der von Felix und Teske[22] zur Funktionsprüfung der Leber eingeführten p-Oxyphenylbrenztraubensäure („Testacid") deutlich zu hemmen vermag. Bei ihrer Versuchsanordnung, deren ausführliche Schilderung an dieser Stelle zu weit führen würde, ist die Schädigung des Leberparenchyms nur auf die Blockierung eines Fermentsystems zurückzuführen. Man kann sich leicht vorstellen, daß es infolge dieser Schädigung zum Ikterus kommt, wodurch die unter A 1. a) oder b) diskutierte Möglichkeit an Wahrscheinlichkeit gewinnen würde.

In der gleichen Weise prüften Felix und Schaefer auch Atebrin (vgl. Kahlstorf[23]) sowie p- und m-Dinitrobenzol, deren schädigende Wirkung auf die Leber schon seit längerer Zeit vermutet worden war. Auch hierbei führten ihre Versuchsergebnisse zu dem Schluß, daß diese Substanzen die Leber schädigen.

Zur Lösung von Fragen mehr theoretischen Interesses zogen sie auch Thioharnstoff und Methylthiouracil in den Kreis ihrer Untersuchungen*. Methodische Gründe erforderten — ebenso wie bei einigen Nitrokörpern — eine etwas abgewandelte Durchführung der direkten Hemmungsversuche in vitro: Es wurde einer Ratte die zu prüfende Substanz subkutan unter die Rückenhaut gespritzt, das Tier getötet, die Leber entnommen und aus ihr eine Suspension hergestellt, die dann wie bei den Versuchen mit Neosalvarsan geprüft wurde. Die wichtigsten Daten der Versuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Zur Fermenthemmung ausreichende Menge in Milligramm.*

Versuche mit	In vitro	In vivo
Neosalvarsan	1	24
Atebrin	1	24
Trinitrotoluol	—	20
5,7-Dinitroisatin	—	etwa 10
m-Dinitrobenzol	1	3
p-Dinitrobenzol	1	—
Thioharnstoff	—	250—1000
Methylthiouracil**	—	70–380

Der Gedankenstrich (—) bedeutet, daß keine Versuche vorliegen bzw. nicht durchführbar sind.

Obwohl sich eindeutig ergab, daß sowohl Thioharnstoff als auch Methylthiouracil den zum Abbau der Testsäure notwendigen Fermentmechanismus blokkieren können, läßt sich der Schluß, daß diese beiden Thyreostatika die Leber schädigen, nicht ziehen: Die Dosen, mit denen eine Fermentschädigung erzielt wurde, überstiegen um 1—2 Zehnerpotenzen die bei den Veruchen mit Neosalvarsan, Atebrin und den Nitroverbindungen angewandten Dosen. (Bei Versuchen in vitro: 1 mg, in vivo: zwischen 3 und 24 mg gegenüber 70—380 bzw. 250 bis 1000 mg.) Eine für Methylthiouracil durchgeführte Umrechnung der Dosis, die von Ratten noch ohne wesentlichen Schaden von der Leber vertragen wurde, auf einen Menschen von 60 kg ergab z. B. eine Menge von 530 Tabletten je 0,1 g. Unseres Wissens ist auch bisher kein Leberschaden nach Verabfolgung von Methylthiouracil bekannt geworden. Bei mit Thioharnstoff vorbehandelten Tieren sah die Leber auffallend blaß aus, so daß bei Thioharnstoff eine gewisse Zurückhaltung in der Beurteilung der Unschädlichkeit angebracht ist.

Wünschenswert wäre, in allen Fällen, in denen die Möglichkeit besteht, experimentelle Aussagen über unbeabsichtigte Wirkungen

* Über die Einzelheiten wird in einer an anderer Stelle erfolgenden Veröffentlichung berichtet werden. Eine kurze Bekanntgabe eines Teiles der Ergebnisse erfolgte auf der Tagung der physiologischen Chemiker in Bonn am 29. 9. 47 [Autoreferat: Angew. Chem. A **60**, 50 (1948)].

** Methyl-Thio-Uracil Boehringer (2-Thio-4-methyl-6-oxypyrimidin) wurde uns von der C. F. Boehringer u. Söhne G. m. b. H., Mannheim-Waldhof, freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wofür ihr auch an dieser Stelle verbindlichst gedankt sei.

von Chemotherapeutika zu machen, auch Methoden heranzuziehen, die geeignet sein können, eine objektive Feststellung über die Schädlichkeit oder Unschädlichkeit zu treffen.

Zusammenfassung.

Es werden die Möglichkeiten der Pathogenese des Salvarsanikterus gegenübergestellt. Auf Grund von Versuchen mit Rattenlebersuspension wird der direkte schädigende Einfluß von Neosalvarsan auf die Leber zu beweisen versucht. — Die in Versuchen mit Neosalvarsan, Atebrin und einigen in toxikologischer Hinsicht bedeutungsvollen Nitrokörpern angewendeten Dosen werden mit denjenigen von Versuchen mit Thioharnstoff und Methylthiouracil verglichen. Für Methylthiouracil kann eine Leberschädigung ausgeschlossen werden.

Literatur.

[1] Fest, Paul: Z. Hautkrkh. usw. **4**, 427 (1948). — [2] Neisser: Arch. Derm. (D.) **121**, 579 (1916). — [3] Rehder u. Beckmann: Z. klin. Med. **84**, 234 (1917). — [4] Mussgnug, G.: Med. Klin. **42**, 856 (1947). — [5] Winkler, Kurt: Z. Hautkrkh. usw. **3**, 8 (1947). — [6] Zieler u. Birnbaum: Handbuch der Salvarsan-Therapie, Bd. 2. 1926. — [7] Herff, v.: Dtsch. med. Wschr. **1937 I**, 898, 934. — [8] Osterwald, Karl Hans: Med. Klin. **42**, 573 (1947). — [9] Winkler, Kurt: Dtsch. Gesdh.wes. **2**, 418 (1947). — [10] Buschke, A., u. Erich Lange: Arch. Verdgskrkh. **37** (1926). — [11] Eppinger: Die Leberkrankheiten. Wien: Springer 1937. — [12] Jahn, Dietrich: Klin. u. Prax. **1**, 121 (1946). — [13] Ruge: Erg. inn. Med. **41**, 1 (1931). — [14] Störmer, A.: Dtsch. Gesdh.wes. **1**, 731 (1946). — [15] Holler: Die epidemischen Gelbsuchtskrankheiten. Berlin u. Wien 1943. — [16] Silbergleit u. Föckler: Z. klin. Med. **88**, 333 (1919). — [17] Hörstebrock, Reinhard: Klin. Wschr. **1947**, 904. — [18] Bigger, J. W.: Lancet **1943 I**, 457. — [19] MacCallum: Brit. J. vener. Dis. **19**, 63 (1943). — [20] Stuhlfauth: Med. Klin. **43**, 346 (1948). — [21] Felix, K., u. H. Schaefer: Hoppe-Seylers Z. **282**, 142 (1947). — [22] Felix, K., u. R. Teske: Hoppe-Seylers Z. **267**, 173 (1941). — [23] Kahlstorf, Adolf: Klin. Wschr. **1947**, 632. — [24] Peters, Gerd: Nervenarzt **18**, 71 (1947).

Dr. H. Schaefer, Frankfurt a. M.
Inst. f. vegetative Physiologie d. Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 138—142 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Über den Einfluß des Rutins auf die Permeabilität der Gefäße.

Von

G. Kuschinsky, W. Dupont und R. Hennes.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Januar 1949.)

Im Jahre 1936 stellten Szent-György und Mitarbeiter[1] aus Paprika und Zitronensaft Extrakte her, welchen sie eine gefäßdichtende Wirkung zuschrieben. Sie nahmen sogar an, daß es sich dabei um ein Permeabilitätsvitamin (Vitamin P) handelte, das außer Vitamin C zur Skorbutverhinderung notwendig wäre. Aus derartigen Auszügen wurde dann das Citrin gewonnen, ein Gemisch aus den Glukosiden Hesperidin und Eriodictyol. Diese erwiesen sich aber bei Nachprüfung der früheren Befunde nicht als antiskorbutisch wirksam (Silva[2], Moll und Küssner[3]). Den genannten Flavonderivaten chemisch nahe verwandt ist das Rutin, ein Rhamnoglukosid des Quercetins. Mit dieser Substanz, die in zahlreichen Blättern und Blüten (Buchweizen, Tabak, Raute usw.) vorkommt, haben einige Forscher eine gefäßabdichtende Wirkung bei Blutungsbereitschaft des Menschen beobachtet (Griffith, Couch und Lindauer[4], Zfass[5], Hein[6]). Um zu prüfen, ob im Experiment eine einwandfreie gefäßdichtende Wirkung des Rutins feststellbar wäre, haben wir Versuche an Fröschen und Mäusen durchgeführt. Dabei wurde die Ödembildung der Hinterbeine bei Durchströmung mit physiologischer Salzlösung als Maß für die Gefäßdurchlässigkeit angesehen.

Methodik.

Zur Prüfung der Ödembildung haben wir in ähnlicher Weise wie frühere Autoren (Schwiegk[7] am Kaninchenohr, Bürger und Bauer[8] am Frosch) die Hinterbeine der Frösche und Mäuse auf einer Briefwaage laufend gewogen. Die Frösche (Temporarien) wurden nach der Methode von Trendelenburg durchströmt, dabei wurde das linke und das rechte Hinterbein jeweils von der Femoralis getrennt durchströmt. In Vorversuchen zeigte sich, daß die Ödembildung beider Beine gleichmäßig verlief, so daß in den Hauptversuchen jeweils ein Bein zur Kontrolle diente, das andere mit einer Rutinlösung* 1:10000 durchströmt wurde.

* Das Präparat wurde uns in freundlicher Weise von der Firma E. Merck, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

Bei den Mäusen wurden in derselben Weise wie bei einem TRENDELENBURGschen Froschpräparat beide Hinterbeine von der Aorta aus durchströmt, nachdem die Eingeweide unterbunden waren. In die Vena cava inf. wurde eine Glaskapillare zur Messung der abfließenden Flüssigkeitsmenge eingebunden. Um eine bessere Ödembildung zu erzielen, wurde als Durchströmungsflüssigkeit auch hier Froschtyrode gewählt. Bei diesen Versuchen an Mäusen wurden nicht einzelne Beine durchströmt, sondern jeweils beide Hinterbeine zusammen. In einer Versuchsreihe wurde Rutin 1:5000 der Durchströmungsflüssigkeit zugefügt, diese wurde mit einer Kontrollreihe ohne Rutin verglichen.

Außer der laufenden Kontrolle des Gewichtes wurde auch die Menge der einströmenden Flüssigkeit an einem kalibrierten Zuflußgefäß abgelesen und die Tropfenzahl der abfließenden Flüssigkeit festgestellt.

Versuchsergebnisse.

A. Versuche an Mäusen.

Die Ergebnisse der Versuche an Mäusen gehen aus Abb. 1 und Tabelle 1 hervor. Es zeigt sich daß die Gewichte der Hinterbeine unter

Tabelle 1. *Ödembildung der Hinterbeine von Mäusen bei Durchströmung mit Froschtyrode bzw. Rutin 1:5000 in Froschtyrode gemessen an der Gewichtszunahme in Gramm. Mittelwert aus 10 Einzelversuchen.*

M_1 Mittelwerte Frosch-tyrode g	σM_1 Mittlerer Fehler Froschtyrode g	M_2 Mittelwerte Rutinreihe g	σM_2 Mittlerer Fehler Rutinreihe g	$M_1 - M_2$ Differenz der Mittel-werte g	$\sigma_{Diff.}$ Mittlerer Fehler der Differenz de Mittelwerte g
1,32	0,076	0,57	0,05	0,75	0,091
2,31	0,11	1,31	0,075	1,0	0,134
3,22	0,134	2,11	0,11	1,11	0,173
3,84	0,145	2,82	0,118	1,02	0,187

Die Differenz der Mittelwerte war bei den 4 Ablesungszeiten signifikant, d. h. $M_1 - M_2 > \sigma_{Diff.} \cdot 3{,}47$.

dem Einfluß der Durchströmung mit Froschtyrode innerhalb von 2 Stunden fortlaufend ansteigen. Der Zusatz von Rutin 1:5000 bewirkt eine Hemmung dieses Gewichtsanstieges. Die Streuung um den Mittelwert ist verhältnismäßig gering, und bei der statistischen Auswertung zeigt sich, daß die Differenz der Mittelwerte signifikant ist. Der Auslauf aus der Vena cava inf. ist in den Kontrollversuchen mit hypotonischer Salzlösung in der ersten halben Stunde am höchsten und fällt in den nächsten 3 halben Stunden ab. In den Rutinversuchen ist der Auslauf zunächst viel geringer. Er steigt in den nächsten halben Stunden langsam an, so daß die Werte der Rutinreihe in den nächsten

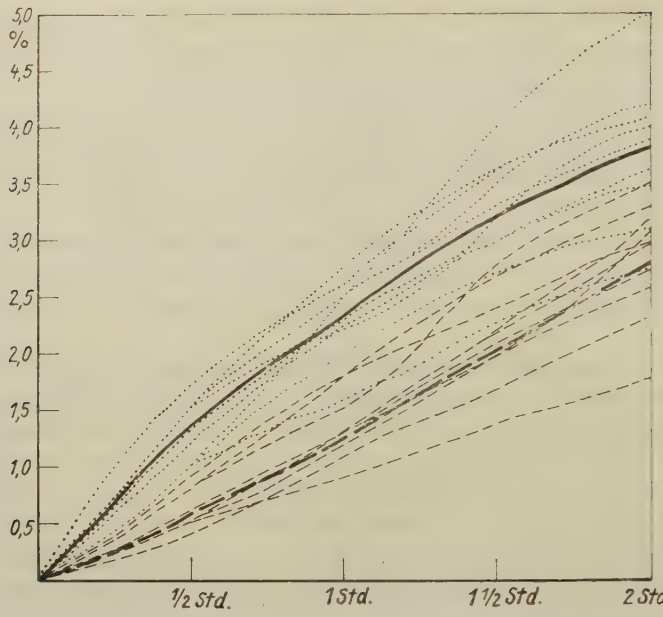


Abb. 1. Ödembildung der Hinterbeine von Mäusen. Durchströmung mit Froschtyrode ····· bzw. Rutin 1:5000 in Froschtyrode ----------, Mittelwerte Froschtyrode ——, Mittelwerte Rutin ——. Abs.: Zeit in Stunden, Ord.: Zunahme in Gramm.

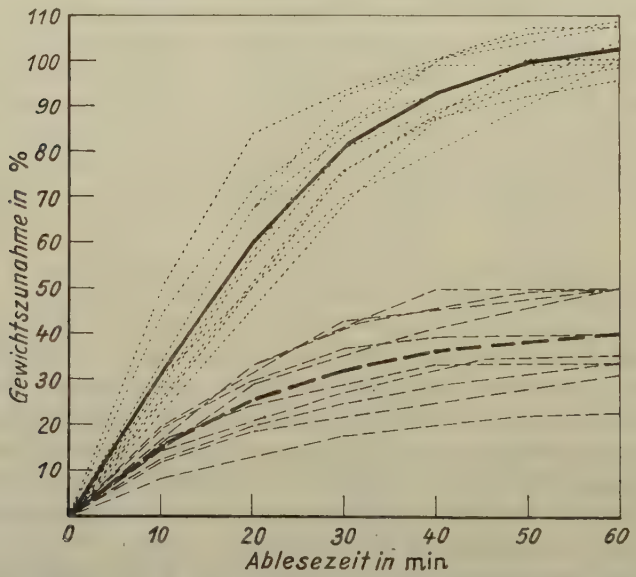


Abb. 2. Ödembildung der Hinterbeine von Fröschen. Durchströmung mit Froschtyrode ····· bzw. Rutin 1:10000 in Froschtyrode ----------. Mittelwerte Froschtyrode ———, Mittelwerte Rutin ——. Abs.: Zeit in Minuten, Ord.: Gewichtszunahme in Prozent.

halben Stunden meistens sogar höher sind als die der Kontrollreihe. Die gesamte Ausflußmenge hat sich dann angeglichen (s. Tabelle 2).

Tabelle 2. *Versuche an Mäusen. Aus der Vena cava abfließende Flüssigkeitsmenge, in Kubikzentimetern in 4 aufeinanderfolgenden halben Stunden.*

	Froschtyrode									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	6	7,5	6,5	6	6,5	5,3	6,5	7	5,7	4,8
2.	3,5	5,0	5,3	4	6	5,1	4,5*	7,4	5	3,7*
3.	3,5	3,0	5,0	1,3	4,2	4	4,8*	3,2*	4,3	3,0*
4.	2	2,3	2,2	0,5	3,4	1,5	1,2*	1,2*	2,4	1,2*
	Froschtyrode + Rutin 1:5000									
1.	1,4	2,2	1,7	2,5	1,1	1,4	3,5	2,1	2,5	1,3
2.	2,3	3,5	1,5*	2,6	2,1	1,3	2,1*	2,3	2,7	2,0
3.	4,7	4,1	2,5*	3,0	2,9	3,1	2,0*	2,4	2,1	3,5*
4.	5,3	4,4	4,0*	3,6	3,9	2,2	2,4*	3,9	5	3,7*

* In diesen Versuchen sind geringe Verluste durch Undichtigkeit nach Umstechung von kleineren Gefäßen entstanden.

B. Versuche an Fröschen.

Tabelle 3. *Ödembildung der Hinterbeine von Fröschen bei Durchströmung mit Froschtyrode bzw. Rutin 1:10000 in Froschtyrode, gemessen an der Gewichtszunahme in Prozent. Mittelwert aus 10 Einzelversuchen.*

M_1 %	σM_1	M_2 %	σM_2	M_1—M_2 Differenz der Mittelwerte	$\sigma_{Diff.}$ Mittlerer Fehler der Differenz der Mittelwerte
31,9	2,7	15,2	1,14	16,7	2,93
59,7	3,83	25,5	2,15	34,2	4,39
80,6	2,77	32,2	2,85	48,4	4,06
92,1	2,32	36,1	3,03	56,0	3,85
98,9	1,83	38,0	2,88	60,9	3,4
102,2	1,31	39,6	3,08	62,6	3,35

Die Differenz der Mittelwerte war bei den 6 Ablesungszeiten signifikant, d. h. $M_1 - M_2 > \sigma_{Diff.} \cdot 3{,}47$.

Abb. 2 und Tabelle 3 zeigt die Ödembildung bei Fröschen nach Durchströmung mit Froschtyrode und Zusatz von Rutin 1:10000. Die Ödembildung hat ungefähr nach 1 Stunde ihr Maximum erreicht. Wegen der verschiedenen Ausgangsgewichte der Froschbeine wurde die Gewichtszunahme in Prozent ausgedrückt. Auch hier zeigt sich wie bei den Mäusen eine signifikante Verminderung der Ödembildung durch Rutinzusatz. Diese Versuche wurden im April bis Juni an Temporarien durchgeführt, in der Mehrzahl an Fröschen, die ohne Nahrung überwintert hatten, zuletzt an einigen frischgefangenen Tieren. Diese zeigten zwar auch Ausschläge, aber geringeren Ausmaßes. Wie aus

der Tropfenzahl hervorgeht, werden die Gefäße durch Rutin in den Froschversuchen nicht verengert, sondern in den meisten Fällen sogar erweitert. Besonders ist diese Erweiterung in der zweiten halben Stunde zu beobachten (s. Tabelle 4).

Tabelle 4. *Versuche an Fröschen. Aus der Femoralis abfließende Flüssigkeitsmenge in Tropfen je Minute. Die Werte wurden wur in 8 von 10 Versuchen bestimmt.*

Minuten	Froschtyrode							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10	26	28	36	40	36	34	28	28
20	26	28	34	32	34	34	26	28
30	24	24	34	32	34	32	25	28
40	24	26	28	30	28	28	24	28
50	20	18	28	28	25	24	24	26
60	18	16	26	24	26	22	24	20
	Froschtyrode + Rutin 1:10000							
10	26	26	34	30	32	28	34	32
20	26	20	34	30	28	28	36	30
30	24	20	32	30	28	26	36	28
40	20	24	34	32	28	26	40	28
50	26	24	34	30	30	26	40	32
60	28	26	34	30	30	30	40	32

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß Rutin in akuten Durchströmungsversuchen bei Fröschen und bei Mäusen imstande ist, die Ödembildung zu vermindern. Wir müssen deshalb annehmen, daß es sich um eine Verminderung der Gefäßdurchlässigkeit handelt. Die Versuche an Mäusen zeigen in den ersten Durchströmungsperioden eine Verminderung der abfließenden Flüssigkeitsmenge. Wir müssen daraus auf eine Gefäßkontraktion schließen, die an sich zu einer Permeabilitätsverminderung führt. In der dritten und vierten Durchströmungsperiode werden allerdings die Werte für die abfließenden Flüssigkeitsmengen fast auf normale Werte erhöht, so daß in dieser Zeit, trotz schon bestehendem Ödem und einer gewissen dadurch erzeugten Kompression der Gefäße, kaum noch mit einer Gefäßverengerung zu rechnen ist. Trotzdem ist die Geschwindigkeit der Ödembildung nicht wesentlich verändert. Schon nach diesen Versuchen an der Maus erscheint also die Annahme berechtigt, daß eine über die Gefäßkontraktion hinausgehende Verminderung der Permeabilität eintritt. Aus den Versuchen am Frosch geht hervor, daß die Ödembildung vermindert werden kann, auch wenn die Gefäße nicht kontrahiert, sondern erweitert werden. Wir können also schließen, daß Rutin in der Lage ist, die Gefäßdurchlässigkeit zu vermindern. Geringere Differenzen der Ödembildung bei frisch gefangenen Fröschen zwischen den Rutin- und den Kontroll-

versuchen sind wohl durch die größere Füllung des Bindegewebes mit Muskelsubstanz zu erklären, so daß geringere Möglichkeiten für die Aufnahme von Wasser gegeben sind.

Die Versuchsprotokolle werden in den Arbeiten von DUPONT[9] und HENNES[10] veröffentlicht.

Zusammenfassung.

1. An Fröschen und an Mäusen werden die Hinterbeine mit physiologischer Salzlösung durchströmt, um die Ödembildung und Gefäßweite zu prüfen.

2. Es zeigt sich eine von Fall zu Fall ziemlich übereinstimmende Ödembildung bei Durchströmung von Fröschen mit Froschtyrodelösung und auch von Mäusen mit Froschtyrodelösung. Die Ödembildung, gemessen an der Zunahme des Gewichtes der Hinterbeine, ist, durch Zusatz von Rutin 1 : 5000 bzw. 1 : 10000 zur Durchströmungsflüssigkeit, signifikant gehemmt. Die Permeabilität wird bei diesen Durchströmungspräparaten auch vermindert, wenn gleichzeitig keine Gefäßkontraktion beteiligt ist.

Literatur.

[1] ARMENTANO, BENTZATH, BÉRES, RUSNYAK u. SZENT-GYÖRGYI: Dtsch. med. Wschr. **1936**, 1325. — [2] SILVA, S. S.: Nature (Brit.) **1937** No 140, 588. — [3] MOLL, TH., u. W. KÜSSNER: Mercks Jber. **51**, 58 (1937). — [4] GRIFFITH, COUCH and LINDAUER: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **55**, 228 (1944). Ref. Brit. med. J. **1947**, No 4508, 771. — [5] ZFASS, H. S.: Virgin. med. Mthl. **74**, 47 (1947). Ref. J. amer. med. Assoc. **134**, 212 (1947). — [6] HEIN, H.: Klin. Wschr. **1948**, 466. — [7] SCHWIEGK, H.: Klin. Wschr. **1944**, 337. — [8] BÜRGER, M., u. M. BAUER: Z. exper. Med. **42**, 296 (1924). — [9] DUPONT, W.: Diss. Mainz 1949. — [10] HENNES, R.: Diss. Mainz 1949.

Prof. Dr. G. KUSCHINSKY, Mainz, Pharmak. Inst. d. Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 144—158 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.

Über die Saponinhämolyse.

I. Mitteilung.

Von

Fritz Jung und Kurt Böhm.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. November 1948.)

Unser Verständnis für die Vorgänge bei der Saponinhämolyse ist durch die Wilbrandtschen[1] Arbeiten erheblich gefördert worden. Nach ihm führt die Bindung des Saponins an die Zellmembran zu einer Permeabilitätssteigerung und diese zur osmotischen Hämolyse. Bei menschlichen Zellen und wohl auch bei einigen anderen Blutarten geht diesem Vorgang eine „primäre" Zerstörung der Zellen durch das Saponin parallel, durch die ohne vorhergehende Schwellung eine sog. nichtosmotische Hämolyse bewirkt wird. Zwei verschiedene Bindungsarten des Saponins an die Membran sollen den zwei verschiedenen Hämolyseformen entsprechen. Durch diese Analyse sind die mehr formalen Ponderschen[2] Überlegungen des Hämolyseprozesses teilweise überholt und ergänzt. Ein Widerspruch besteht aber zu einigen neueren Ergebnissen Schmidt-Thomés[3], der für die Saponinhämolyse ausschließlich eine Reaktion des Digitonins mit dem Cholesterin der roten Blutzelle verantwortlich macht, also einen einheitlichen Angriffspunkt an der Zelle fordert.

Eine eingehende Durchsicht der älteren, sehr umfangreichen und zum Teil bei Kofler[4] zusammengestellten, einschlägigen Literatur führt zu weiteren Bedenken gegen die Ansicht Schmidt-Thomés[3]. Einerseits scheinen nämlich die Blutkörperchenschatten nach Beendigung der Hämolyse der Lösung noch Saponin zu entziehen, andererseits wird von verschiedenen Autoren auch dem Hämoglobin die Fähigkeit zur Saponinbindung und damit zur Beeinflussung der Hämolyse zugeschrieben. Auch die außerordentlich starke p_H-Abhängigkeit der hämolytischen Wirkung der einzelnen Saponine ist zunächst nicht gut mit der Bildung einer einfachen und wohldefinierten Saponin-Zellcholesterin-Additionsverbindung zu vereinen. Sicherlich unrichtig ist die Vermutung Schmidt-Thomés[3], daß die verschiedenen Werte des „hämolytischen Index" (also des Saponin-Titrationswertes) verschiedener Blutarten auf den verschieden großen Cholesteringehalt der Zellen zurückzuführen seien. Diese bereits von Rywosch[5] und anderen ausgesprochene Vermutung wird nämlich von Kofler[4] auf Grund eigener Befunde und Überlegungen entschieden abgelehnt und widerlegt.

Gegenüber der Kritik an den Angaben Schmidt-Thomés[3] muß aber betont werden, daß seine durch Blutkörperchentitration ermittelten Cholesteringehalte der roten Zelle gut mit anders ermittelten Werten

übereinstimmen und daß die auf seinen Feststellungen aufgebaute Cholesterinbestimmungsmethode nach dem Urteil zahlreicher anderer Autoren ausgezeichnet und präzis ist. Bei dieser Sachlage erscheint eine Nachuntersuchung der quantitativen Verhältnisse bei der Saponinhämolyse wünschenswert. Eine weitere Feststellung Schmidt-Thomés[3] ist aber so interessant, daß uns eine Überprüfung unumgänglich schien: Nach ihm zerfallen unter Saponineinwirkung die Zellstromata völlig in einzelne Bruchstücke und Schollen. Das würde ein sehr wichtiger Hinweis auf die Struktur der Stromata bzw. der Membranen sein. Diese Erscheinung wurde aber bei den älteren lichtoptischen (speziell der Dunkelfeld-) Untersuchungen nicht festgestellt. Eine Stromatolyse durch Saponin wurde zwar von einzelnen Autoren gesehen, scheint aber nur ausnahmsweise und nur nach langer Einwirkung hoher Konzentrationen bestimmter Saponine vorzukommen (Bechold[6], Ponder[2], Plattner und Hintner[7]).

Methodik.

Zur Messung der Blutkörperchenresistenz diente das von Kortüm angegebene Spektralphotometer, das leistungsmäßig dem seither angewandten Havemannschen Gerät entspricht. Bei Messung des Trübungsgrades von Zellsuspensionen wurde das Filter RG 3 und bei Bestimmung des Hämoglobingehaltes nach Abzentrifugieren der nicht hämolysierten Zellen das Filter VG 9 verwandt. Sonst war im einzelnen die Technik dieselbe wie in früheren Mitteilungen. Die Reaktionstemperatur betrug 40°; als Milieu diente eine von v. Muralt angegebene gepufferte physiologische Lösung. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Siemensmikroskop vorgenommen. Wir sind den *Farbwerken Höchst* für die Erlaubnis, ihr Instrument zu benützen, und für ihre großzügige Hilfe zu Dank verpflichtet. Das alte Präparationsverfahren wurde beibehalten. Der Wechsel des Arbeitsorts lehrte uns, daß eine befriedigende Präparation der Zellen bzw. Membranen nur mit sehr hochtourigen Zentrifugen möglich ist und daß die üblichen Laboratoriumsgeräte unzureichend sind. Es wurde daher eine kleine Tischzentrifuge neu gebaut, welche etwa 5000 Umdrehungen leistet. Sämtliche Versuche wurden mit Digitonin-Merck durchgeführt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf eingewogene Substanz; sie sind etwas zu hoch, da das Präparat nicht vollständig in Lösung ging.

I. Quantitative Gesetzmäßigkeiten bei der Saponinhämolyse.

A. Vorbemerkung.

Die quantitativen Verhältnisse bei der Saponinhämolyse wurden von Ponder[2] eingehend studiert. Er betrachtet bei der Auswertung seiner Meßergebnisse die hämolysierten Zellen als Reaktionsprodukt, Saponin und unveränderte Zellen als Reaktionspartner und versucht dann, die Hämolyse nach den Regeln des Massenwirkungsgesetzes zu behandeln. Damit kann er den Ablauf der Hämolyse nach Einführung entsprechender Konstanten und Annahmen recht gut beschreiben. Wir möchten aber in Kenntnis der Wilbrandtschen[1] Arbeit seinen Formeln nur eine formale Bedeutung zubilligen. Grundsätzlich wichtig ist sein Ergebnis, daß eine befriedigende Behandlung des experimentellen Materials nur möglich ist,

wenn man der einzelnen Zelle einer Blutprobe keine definierte Saponinresistenz bzw. Bindungsfähigkeit zuweist, sondern sie als Glied eines Kollektivs auffaßt. Ponder gelangt über seine Meßergebnisse auch zur Darstellung dieser Resistenzverteilung, die selbst ziemlich stark von Blutprobe zu Blutprobe schwankt und sehr unsymmetrisch ist. Besonderen Schwierigkeiten begegnet Ponder bei Variation der Zellen im Versuchsansatz, da bei einer bestimmten Saponinkonzentration mit steigender Zellzahl die Zahl der hämolysierten Zellen (sein formales Reaktionsprodukt) von einer bestimmten Zellkonzentration an wieder abnimmt. — Wir haben bei unseren Versuchen jeweils nur die Endwerte der Hämolyse bestimmt und uns nicht für ihren Verlauf interessiert, welcher nach den Versuchen Willbrandts durch verschiedene Faktoren (z. B. Zusammensetzung des Milieus) erheblich beeinflußt werden kann. Es drückt sich im Verlauf nicht nur die fort schreitende Saponinbindung an die Zellen, sondern auch die mehr oder minder schnelle osmotische Schwellung aus.

B. Variation der Digitoninkonzentration und Zellenzahl.

In einer ersten Versuchsreihe wurde bei konstanter Digitoninkonzentration die Zellenzahl im Ansatz in möglichst weitem Umfang verändert. Die Reaktionsansätze wurden etwa 6 Stunden bei 40° gehalten, um ja das Ende der Hämolyse zu erreichen. Trägt man die *Zahl* der hämolysierten Zellen gegen die Zellkonzentration auf, so steigt diese zu einem Maximum an, um dann wieder abzusinken. Da bei höheren Zellkonzentrationen unter unseren Versuchsbedingungen eine leichte Spontanhämolyse nicht zu vermeiden war, sinkt die Hämolyse allerdings nicht ganz auf 0% ab, sondern steigt später langsam ein zweites Mal an. Ein ähnliches Verhalten wurde früher von uns für die Sublimathämolyse festgestellt und abgebildet. Die Vorgänge werden übersichtlicher, wenn man bei einer graphischen Darstellung auf der Ordinate den *Prozentsatz* hämolysierter Zellen und auf der Abszisse den Logarithmus der Zellenzahl aufträgt (Abb. 1). Für verschiedene Saponinkonzentrationen erhält man parallele Kurven. Diese kann man am einfachsten als Summenkurven Gausscher Integrale deuten; das entspricht auch der früheren Feststellung Ponders.

Die Ursache der Verteilung könnte eine verschiedene Saponinaffinität oder -kapazität der einzelnen Zellen, aber ebenso auch ein Durchmischungseffekt sein. Da weder bei Änderung der Zellzahlen, noch bei Variation des Mischungsverfahrens erhebliche Änderungen der Verteilungskurve auftreten, darf die Hämolyseverteilung als Ausdruck einer Resistenzverteilung der Zellen aufgefaßt werden. Das Ergebnis lehrt, daß man die hämolytische Wirkung einer bestimmten Saponinkonzentration gegenüber einer bestimmten Zellsuspension weder — wie Meneghetti — mit Hilfe der *beginnenden* noch — nach dem hämolytischen Index — mit Hilfe der *vollendeten* Hämolyse beurteilen darf. Vergleicht man nämlich in Abb. 1 auf den einzelnen Versuchskurven die Punkte, an welchen die Suspensionsflüssigkeit einen bestimmten Rosaton annimmt, d. h. eine bestimmte Zahl der Zellen hämolysiert ist, so sieht man, daß diese Punkte auf den einzelnen Kurven einander nicht entsprechen. Zum Vergleich des hämolytischen Effekts braucht man aber korrespondierende Punkte. Am besten geeignet scheint hier der

50%-Wert der Hämolyse (entsprechend dem Mittelwert = dem Medianwert der vorliegenden Verteilung). Durch Angabe der Steilheit der Kurve kann eine weitere Aussage gewonnen werden. Sie wird am einfachsten durch die Streuung (Parameter s des entsprechenden Gaussschen Integrals) wiedergegeben. In einer Reihe von Versuchen, auch am Blut verschiedener Personen, zeigte sich s von annähernd derselben Größe. (Die von Ponder beobachteten, stark variierenden Streuungen beruhen wohl auf der Auswertungsmethodik.) Je nach der Versuchsanordnung besitzt s eine andere Dimension, es betrug z. B. 0,203 log (Zellen je Kubikzentimeter) oder 0,101 log (Saponin je Kubikzentimeter) oder 0,203 log (Saponin²/Zellen je Kubikzentimeter).

Aus Abb. 1 läßt sich für beide Versuchsreihen entnehmen, daß bei Verdopplung der Saponinkonzentration derselbe Hämolysegrad (in Prozent) erst bei der 4fachen Zellenzahl auftritt. Diejenige Zellenzahl,

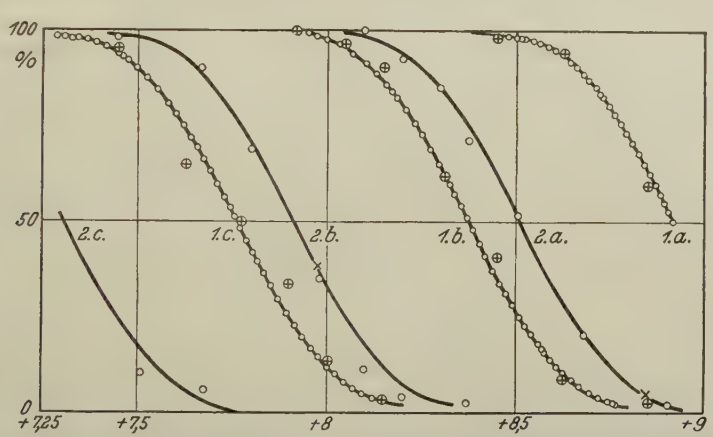


Abb. 1. Ordinate: Prozent Hämolyse. Abszisse: log der Zellen/cm³ Hämolyseansatz
1. Blut F. J. a) $1{,}06 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin,
b) $0{,}53 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin,
c) $0{,}26 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin.
2. Blut K. B. a) $0{,}87 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin,
b) $0{,}43 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin,
c) $0{,}22 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Digitonin.
Reaktionstemperatur 40°, Hämolysedauer etwa 6 Stunden. Auf Kurve 2a und 2b sind mit × Punkte angegeben, an welchen die Zahl der hämolysierten Zellen — also der Farbstoffgehalt der Suspensionslösung — derselbe ist. Vgl. hierzu Text S. 146.

bei welcher also ein bestimmter (etwa 50%) Hämolysegrad auftritt, ist somit proportional dem Quadrat der Saponinkonzentration. Die numerischen Werte für den Proportionalitätsfaktor in beiden abgebildeten Versuchen betragen 1,3 und $2{,}3 \cdot 10^{-19}$ g² je Zelle und cm³. In weiteren Versuchen ergaben sich Werte derselben Größenordnung. Diese quantitative Beziehung ließ sich auch unter anderen Bedingungen ermitteln. Sowohl in Versuchsreihen, in denen bei konstanter Zellenzahl die Saponinkonzentration variiert wurde, wie in Reihen, in denen bei einem konstanten Verhältnis Saponin/Zelle die Menge des Suspensionsmittels verändert wurde, ergaben sich dieselben Werte für den

Proportionalitätsfaktor wie auch die entsprechenden Werte für die Streuung.

Die konstante Beziehung Saponin^2/Zellen weist auf ein echtes Gleichgewicht hin. Das Saponin muß also vor Eintritt der Hämolyse reversibel an die Zelle gebunden werden.

Tatsächlich läßt sich in einem Saponin-Zellgemisch durch Verdünnen mit Suspensionsmittel der Hämolysevorgang unterbrechen, wie Wilbrandt gezeigt und bereits als Hinweis auf die Reversibilität der Bindung verwertet hat. Eine quadratische Beziehung zwischen Saponinkonzentration und Hämolysegeschwindigkeit hat Ponder seinerzeit schon festgestellt. Ebenso wie Ponder konnten auch wir Abweichungen vom Exponenten 2 feststellen.

C. Beeinflussung der Digitoninhämolysen.

Unter den zahlreichen Beispielen, die Kofler[4] für die Abhängigkeit der Saponinhämolyse von äußeren Faktoren zusammenstellt, war für uns der Einfluß des osmotischen Drucks, zugesetzten Hämoglobins und die Erwärmung der Zellen auf über 50° von besonderem Interesse.

1. Zur Herstellung von Hämolysereihen unter verschiedenen osmotischen Bedingungen wurde als Suspensionsflüssigkeit eine doppelt konzentrierte und eine auf zwei Drittel mit Wasser verdünnte physiologische Lösung verwandt. Die Hämolysegeschwindigkeit war in der hypertonen Lösung erheblich geringer, in der hypotonen Lösung schneller als bei Isotonie. Nach einigen Stunden stellte sich aber sowohl bei Hypo- wie Hypertonie derselbe Endwert ein wie in den Kontrollen. Die Bindung des Saponins an die Zellen ist somit vom osmotischen Druck praktisch unabhängig; entsprechend den Wilbrandtschen Vorstellungen wird lediglich die Hämolyse*geschwindigkeit* verändert. Bei kurzfristiger Beobachtung können daher erhebliche Differenzen vermerkt werden.

2. Wir haben früher angegeben, daß nach Erhitzen von Erythrozyten auf etwa 48° ein „Abschmelzen der Lipoide" in Form kleiner Kugeln beobachtet werden könne[9]. Diese Kugeln enthalten Hämoglobin und besitzen gelegentlich sogar eine elektronenoptisch feststellbare Membran. Auf die Natur dieser Erscheinung, die wir elektronenoptisch inzwischen eingehender untersucht haben und die von gewisser Bedeutung für die Struktur der roten Zellen ist, wird an anderer Stelle eingegangen werden. In dieser Weise veränderte Zellsuspensionen (10 Min. bei 52°) wurden in Resistenzreihen mit Saponin angesetzt (Abb. 2). Trotz einer nicht unerheblichen Spontanhämolyse werden die Zellen durch eine derartige Behandlung insgesamt „resistenter". Durch Auszählen läßt sich belegen, daß mit zunehmender Hämolyse der Anteil an Kugeln im Präparat zunimmt. In einem Versuch ergab sich:

vor Versuchsbeginn . . . . . 3,5 Kügelchen je Zelle,
bei 39% Hämolyse . . . . . 6,8 Kügelchen je Zelle,
bei 64% Hämolyse . . . . . 16 Kügelchen je Zelle,
bei 100% Hämolyse . . . . . unbestimmbar.

Diese Resistenzsteigerung braucht keineswegs eine grundsätzliche Änderung des Reaktionsvermögens der Blutzellen gegenüber dem Saponin bedeuten. Nimmt man nämlich an, daß jede Blutzelle bzw. im erhitzten Ansatz jedes Element, d. h. jede Blutzelle und jedes Kügelchen, zum Vollzug der Hämolyse mindestens eine bestimmte Anzahl Saponinmoleküle binden müssen, so wird bei rein formaler Rechnung für denselben Hämolysegrad nach Abspaltung der Kügelchen mehr Saponin benötigt. Eine Vervierfachung der Zahl der Elemente, wie z. B. im Versuch etwa 3 Kügelchen je Zelle, würde daher bedeuten, daß erst bei der doppelten

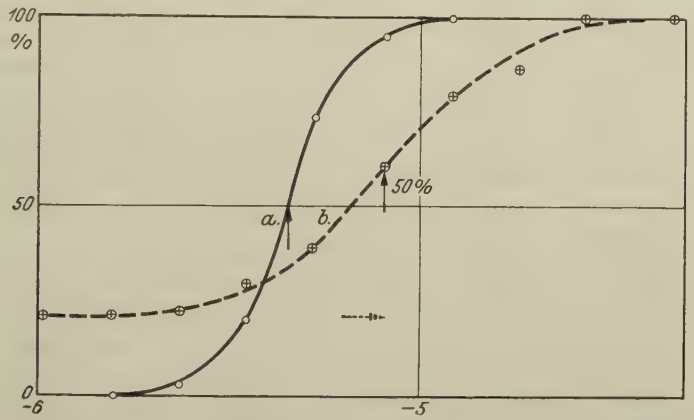


Abb. 2. Ordinate: Prozent Hämolyse. Abszisse: log der Saponinkonzentration im Hämolyseansatz (g/cm³); im Ansatz sind 1,3 · 10⁸ Zellen/cm³. *a* unbehandelt; *b* 10 Min. auf 50—52° erhitzt. Reaktionstemperatur 40°, Hämolysedauer 4 Stunden.

Saponinkonzentration derselbe Hämolysegrad erreicht wird. Da aber die einzelnen Elemente sehr verschiedene Mengen Hämoglobin in Freiheit setzen, muß die entstehende Hämolysekurve unregelmäßig werden. In dem abgebildeten Versuch ist die Steigerung der „Resistenz" von log Saponin = 0,65—6 auf 0,90—6 (bei Vernachlässigung der Spontanhämolyse und der veränderten Streuung) — also auf fast das Doppelte — im geforderten Umfang deutlich.

Unser Ergebnis entspricht nicht einer von Kofler zitierten Angabe von Jarisch, nach welcher Erythrozyten nach Erwärmen eine verringerte Saponinresistenz besitzen sollen. In der angeführten Originalarbeit von Jarisch[10] werden aber keine Versuche mit Saponin an erwärmten Zellen wiedergegeben, sondern es wird nur in einem Nebensatz vermerkt, daß die Widerstandskraft der Blutkörperchen nach Erwärmen auf 55° und Wiederabkühlen gegenüber *allen* Hämolytizis verändert ist. Soweit also der Widerspruch überhaupt besteht, dürfte er wiederum auf eine schnellere Hämolyse der erwärmten Zellen in Gegenwart eines Saponinüberschusses zurückzuführen sein.

3. Nach Frei[11], Ponder[2] und Wilbrandt[1] beeinflußt Hämoglobin die Saponinhämolyse. Insbesonders soll durch das während der Hämolyse austretende Hämoglobin ihr Ablauf verändert werden. Da beim

Umkristallisieren von Eiweißkörpern Alkohol und Lipoide mitkristallisieren und wir bei der üblichen Hämoglobindarstellung eine solche Möglichkeit nicht ausschließen konnten, haben wir unsere Hämoglobinlösungen durch längeres Zentrifugieren und Adsorption an Aluminiumoxyd zu reinigen versucht. Die Lösungen waren optisch vollständig klar. In dem abgebildeten Versuch wurde der Zellsuspension vor Versuchsbeginn so viel Hämoglobin zugefügt, daß das zugesetzte Hämoglobin mengenmäßig dem in den Zellen enthaltenen gerade entsprach. Dann wurde der Versuch wie üblich angesetzt, d. h. die Saponinlösung zu den Zellsuspensionen gegeben. Wie Abb. 3 zeigt, bleibt das zugesetzte Hämoglobin praktisch ohne jeden Einfluß auf die Hämolyse. Während der Hämolyse freiwerdendes Hämoglobin ändert daher die quantitativen Verhältnisse ebensowenig.

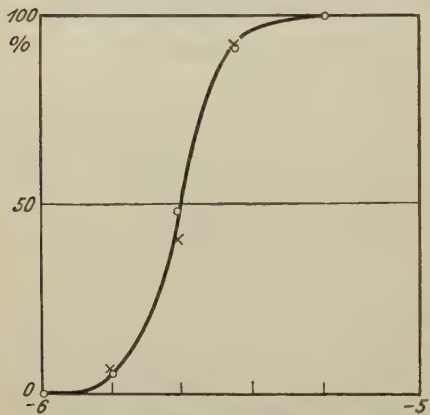


Abb. 3. Ordinate: Prozent Hämolyse. Abszisse: log der Saponinkonzentration im Hämolyseansatz (g/cm³), im Ansatz sind $1{,}25 \cdot 10^8$ Zellen/cm³; —o—o—o Ergebnisse in normaler Suspensionslösung; —x—x—x Ergebnisse in Suspensionslösung, welcher Hämoglobin in eben der Menge zugesetzt war, wie in den Erythrozyten enthalten war und bei der Hämolyse frei wurde. Hämolysedauer 6 Stunden.

Frei[11] gibt nun an, daß die hemmende Wirkung des Hämoglobins auf die Saponinhämolyse besonders deutlich ist, falls es vor Versuchsbeginn einige Zeit mit dem Saponin in Berührung gestanden hat. Dies konnten wir bestätigen. Wird die zum Versuch verwandte Saponinlösung etwa eine Stunde vor Versuchsbeginn mit einer Hämoglobinlösung zusammengebracht und dann die Verdünnungsreihe des Saponins hergestellt, so verliert sie einen erheblichen Teil ihrer Wirksamkeit. Doch müssen dazu relativ konzentrierte Hämoglobinlösungen verwandt werden. Wird der Versuch entsprechend der in Abb. 3 beschriebenen Anordnung angesetzt, jedoch mit dem Unterschied, daß das Hämoglobin 30 Min. vor den Zellen mit der Saponinverdünnungsreihe zusammengebracht wird, so ergibt sich zwischen hämoglobinhaltigen und -freien Reihen kein wesentlicher Unterschied. Ähnlich wie bei der Reaktion des Saponins mit Zellen dürfte daher auch in diesem Fall die Konzentration des Reaktionspartners eine große Rolle spielen.

II. Morphologische Veränderungen bei der Digitoninhämolyse.

A. Membranveränderungen durch Digitonin.

Durch osmotische Hämolyse und anschließendes Waschen der Stromata mit destilliertem Wasser, dem einige Tropfen physiologischer

Lösung zugesetzt waren, konnten die Membranen isoliert und zum Versuch in physiologischer Lösung aufgeschwemmt gewonnen werden. Der Zustand der Membranen wurde lichtoptisch im Hell- und Dunkelfeld sowie mit Hilfe des Elektronenmikroskops beobachtet. Die Saponinwirkung auf die Membranen konnte durch Zusatz von OsO_4 oder durch Verdünnung des Ansatzes mit Wasser in jedem Augenblick unterbrochen werden.

Die *lichtoptischen* Beobachtungen lassen sich kurz zusammenfassen: Nach Zugabe des Saponins kam es zu einer Schrumpfung und Deformierung der Membranen. Im Dunkelfeld wurden überall an der Membran feinste leuchtende Körnchen sichtbar, welche sich vergröberten und vermehrten, bis schließlich statt der zarten, in ihren Konturen sichtbaren Membran, nur ein leuchtendes Koagulat vorlag. Die geschrumpften Membranen verklumpten leicht. Stromatolyse konnte auch bei länger dauernder Einwirkung höherer Saponinkonzentrationen niemals beobachtet werden.

Die *elektronenoptischen* Feststellungen müssen im einzelnen an Hand der Abbildungen beschrieben werden.

1. 1 Min. in Digitoninlösung von 4 mg-%. Vgl. Abb. 4a und b. Die lichtoptischen, noch unveränderten Membranen sind auch elektronenoptisch gut erhalten. Sie zeigen eine scharfe Faltung und keine Spur einer Schrumpfung. Die für osmierte Membranen bezeichnende feine Strukturierung ist weicher und deutlicher geworden, über und neben der Membran werden eigentümliche Streifchen und Blättchen sichtbar, die sich von der Zelloberfläche losgelöst haben dürften.

2. 15 Min. in Digitoninlösung 4 mg-%. Die Zellen sind lichtoptisch im Dunkelfeld zum größten Teil geschrumpft und mit leuchtenden Körnchen besetzt. Das Bild entspricht lichtoptisch wie elektronenoptisch dem folgenden Versuch.

3. 2—3 Sek. bei Digitoninlösung 40 mg-%. Der einzige Unterschied dürfte die größere Einheitlichkeit des Bildes bei höherer Konzentration sein. — Die verschiedenen Stadien der Veränderung sind in elektronenoptischen Präparaten nebeneinander vorhanden. Die am wenigsten veränderten Zellen sind noch nicht geschrumpft, ihre Membran ist zart und sehr unregelmäßig strukturiert. Die Ablösung der Schüppchen ist deutlich und man kann sich vorstellen, daß die unregelmäßige Strukturierung durch die Überlagerung mit diesen Schüppchen vorgetäuscht wird. Einzelne Stellen der Membran zeigen noch die ursprüngliche typische Struktur. Die Mehrzahl der Zellen ist geschrumpft, sie besitzen im elektronenoptischen Bild deswegen eine sehr unregelmäßige Struktur und eine wechselnde optische Dichte. Die Schüppchen umgeben die geschrumpften Zellen wie ein Strahlenkranz. Vollständige Loslösung von der Zelle wurde aber nur selten festgestellt, daher dürfte noch irgend eine Bindung an die Zelle bestehen (Abb. 4c).

4. Mehrere Minuten Digitoninlösung 40 mg-%. Soweit man trotz Schrumpfung und Schüppchenbildung im elektronenoptischen Präparat noch dünnere Membranbezirke zur Darstellung bekommt, ist ihre Struktur vergröbert und sehr unregelmäßig. Es sind nunmehr Denaturierungsprozesse an ihr aufgetreten, wie wir bei einem Vergleich mit früheren Befunden feststellen können. Auffallend ist, daß die Denaturierungsprodukte erheblich weniger kontrastreich sind als nach Behandlung der Membranen mit Wärme, Sublimat und AsH_3.

Der Durchmesser der Membranen ist infolge der Schrumpfung nunmehr auf fast 50% zurückgegangen. Auch diese Zellen werden von den Schüppchen noch wie von Strahlen umgeben.

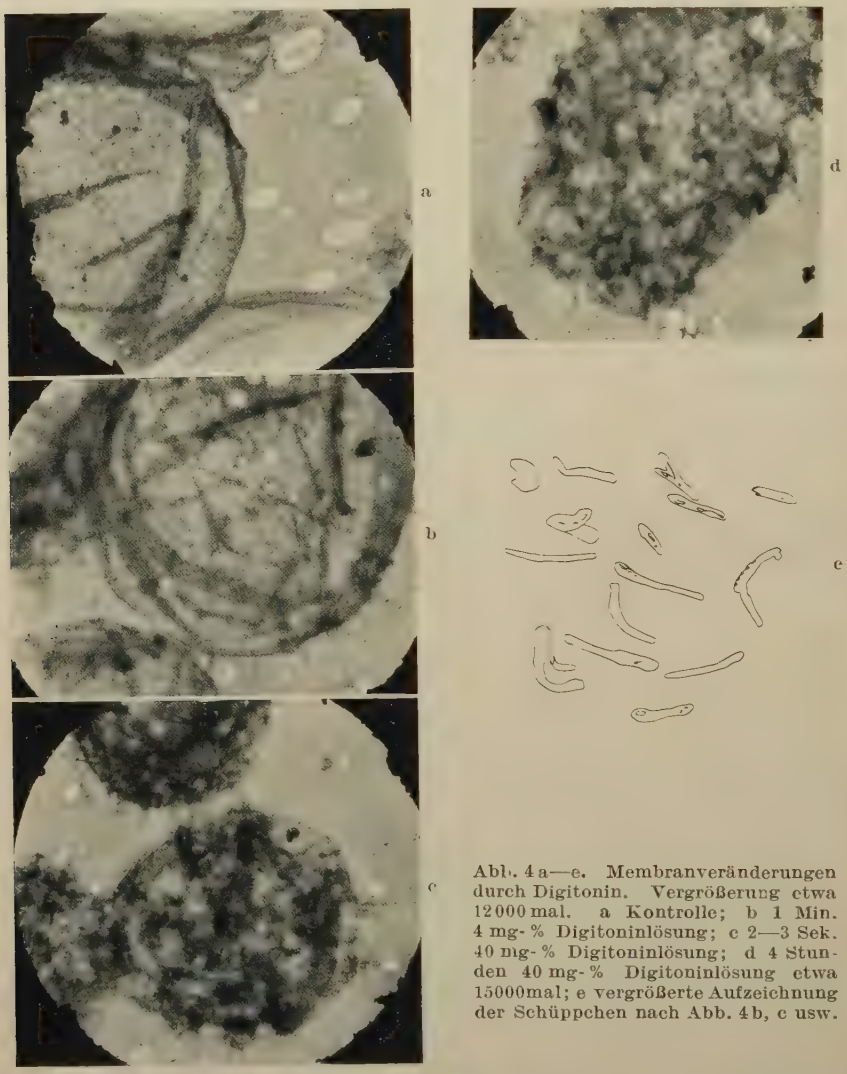


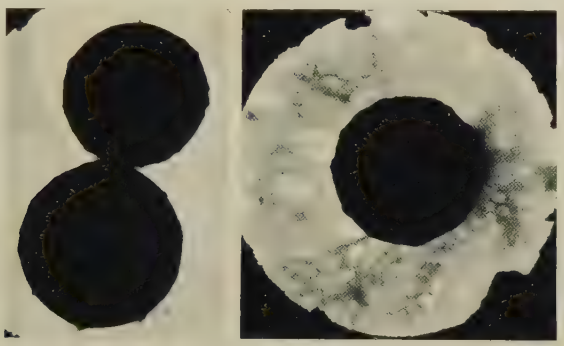
Abb. 4a—e. Membranveränderungen durch Digitonin. Vergrößerung etwa 12000mal. a Kontrolle; b 1 Min. 4 mg-% Digitoninlösung; c 2—3 Sek. 40 mg-% Digitoninlösung; d 4 Stunden 40 mg-% Digitoninlösung etwa 15000mal; e vergrößerte Aufzeichnung der Schüppchen nach Abb. 4b, c usw.

5. Mehrere Stunden Digitoninlösung 40 mg-%. Das lichtoptische Bild ist dasselbe geblieben. Zeichen von Stromatolyse sind nicht nachweisbar. Elektronenoptisch sind ebenfalls die stark geschrumpften und von einem Schüppchendetritus umgebenen Zellen noch in ihrer ungefähren Form erhalten. Allerdings ist bei vielen die Eiweißmembran vollständig zerstört und in ein typisches, jedoch kontrastarmes Koagulat umgewandelt (Abb. 4d).

Im Hinblick auf die andersartigen Ergebnisse Schmidt-Thomés wird betont, daß diese Beobachtungen in zahlreichen Versuchsserien, zum Teil auch unter etwas anderen Bedingungen, immer wieder reproduziert werden konnten. Vollständiger Zerfall der Membranen wurde ein einziges Mal festgestellt, als nämlich zu Beginn der Arbeit am Elektronenmikroskop an einem sehr heißen Sommertag mit mangelhaften Zentrifugen gearbeitet werden mußte.

B. Ablauf der Digitoninhämolyse.

Digitonin-Zellgemische wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach ihrer Herstellung in 1% OsO_4 eingetropft, wodurch eine augenblickliche Fixation der gegenwärtigen Hämolysephase erreicht werden



a b

Abb. 5 a u. b. Digitoninhämolyse, etwa 10000mal vergrößert. a Sofort nach Einbringen in Digitonin (10% Digitonin und 10^8 Zellen/cm³), fixierte Probe. b nach 3—4 Sek. Ausbruch des Hämoglobins.

konnte. In dem unten geschilderten Versuch betrug die Digitoninkonzentration im Gemisch 10 mg-%, die Zellkonzentration 10^8 je Kubikzentimeter. Ein solches Gemisch ist in wenigen Minuten vollständig hämolysiert.

1. Sofort nach dem Mischen fixierte Probe (Reaktionsdauer etwa 2—3 Sek.). Die Zellen sind im Hellfeld völlig unverändert. Bei guter Beleuchtung zeigen sie im Dunkelfeld an einzelnen Stellen eine feine Bestäubung oder auch feinste Körnchen, welche an unbehandelten fixierten Zellen nicht wahrnehmbar sind. Elektronenoptisch haben die Zellen nicht die von fixierten Zellen her bekannte glatte Kontur, sondern besitzen an einzelnen Stellen spitze oder dreieckige Zipfelchen (Abb. 5a). Diese sind mitunter so lang, daß man sie als Dornen bezeichnen könnte. Vermutlich entspricht dieses Phänomen der oben beschriebenen Schüppchenablösung?

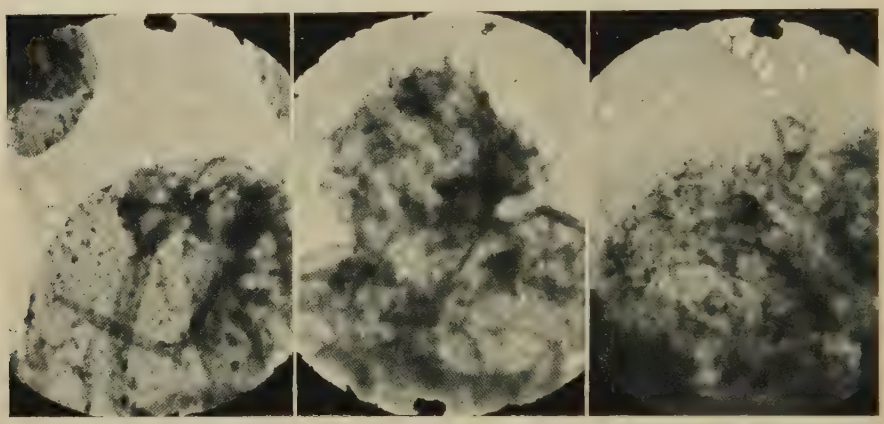
2. Nach 3—4 Sek. An zahllosen Zellen bricht nun ohne sichtbare Ruptur der Membran das Hämoglobin aus (Abb. 5b).

3. Nach etwa 60 Sek.: Neben zahlreichen Hämoglobinkoagula finden sich Membranen, die ähnliche Veränderungen aufweisen, wie oben unter A beschrieben wurde. Die massiven Hämoglobinkoagula erschweren aber eine Beurteilung erheblich.

C. Stromata nach Digitoninhämolyse.

Um die Membranen nach Abschluß des lytischen Prozesses eingehender zu studieren, wurde nach Beendigung eines der in Abschnitt I geschilderten Hämolyseversuche durch kräftiges Zentrifugieren der Hämolyserest isoliert und durch weiteres Waschen mit physiologischer Lösung oder destilliertem Wasser hämoglobinfrei gewaschen. Die Untersuchung der isolierten Membranen erfolgte wie oben.

1. Probe nach Eintritt geringfügiger Hämolyse (etwa 10%). Lichtoptisch verhalten sich die isolierten Membranen nicht anders wie normale Membranen. Elektronenoptisch finden sich im Präparat meist unveränderte Membranen.



a b c

Abb. 6 a—c. Membranen nach Ablauf der Digitoninhämolyse, etwa 12000mal. a Aus 90% hämolysierter Probe; b aus 100% hämolysierter Probe geringer Saponinüberschuß; c aus 100% hämolysierter Probe größerer Saponinüberschuß. (Abb. b und c geben Randpartien von Membrankonglomeraten wieder.)

Daneben sind einzelne mit einer gewissen Strukturierung der Membran nachweisbar. Schüppchenbildung tritt nicht auf.

2. Probe nach 90% Hämolyse. Trotz des erheblichen Hämolysegrades ist die Mehrzahl der Membranen noch relativ unverändert. Schrumpfung, Deformierung und nunmehr auch Ablösung von Schüppchen kommt vor und ist an einzelnen Zellen sehr deutlich. Das Bild entspricht etwa den unter II A beschriebenen und abgebildeten Zellen (vgl. Abb. 6a).

3. Vollständig gelöste Proben — geringer Saponinüberschuß. Nunmehr ist die Ablösung der Schüppchen, die Schrumpfung und Deformierung der Membranen wieder sehr deutlich. Die weitgehende Verklumpung kann die elektronenoptische Untersuchung erheblich erschweren. Die Zerstörung der Membranen geht trotz der relativ geringen Saponinkonzentrationen etwa so weit wie in der Serie A unter den höchsten Saponinkonzentrationen. Man muß daher annehmen, daß das Austreten des Hämoglobins die Membran beschädigt (Abb. 6b).

4. Vollständig gelöste Proben — höhere Saponinkonzentration. Diese Präparate bieten elektronenoptisch nichts Neues mehr. Die Verklumpung der Zellen erschwert die Beurteilung und Untersuchung wieder erheblich (Abb. 6c).

Auch in dieser letzten Versuchsgruppe konnte der von Schmidt-Thome festgestellte völlige Zerfall der Membranen nicht festgestellt werden.

Während die Schrumpfung der Membran und ihre völlige Koagulation unter dem Einfluß höherer Saponinkonzentrationen ein Vorgang ist, den wir auf Grund unserer seitherigen elektronenoptischen Studien schon einigermaßen beurteilen können, ist das Auftreten der Schüppchen ein neuartiges Phänomen. Wir zweifeln nicht, daß Schmidt-Thomé diese Gebilde bereits gesehen hat, wenn auch seine Abbildungen hierüber keine Klarheit geben.

In weiteren Versuchen bemühten wir uns um die Natur dieser Gebilde. Das Ergebnis dieser Versuche wird noch in einem anderen Zusammenhang Bedeutung erhalten, hier soll zunächst nur kurz festgestellt werden:

1. Werden die saponinbehandelten — also schüppchentragenden — Membranen mittels Harnstoff oder NaOH behandelt und anschließend das Reaktionsgemisch scharf zentrifugiert, so enthält das Sediment elektronenoptisch Fäden und Bälkchen, welche größenordnungsmäßig den Schüppchen entsprechen. Es ist also möglich, diese Gebilde von den Zellen loszulösen.

2. Nach Gallensäurehämolyse isolierte Membranen vermögen bei Saponinbehandlung keine Schüppchen mehr zu bilden. Da solche Membranen wahrscheinlich lipoidfrei sind, müssen diese Schüppchen mit den Zellipoiden in irgendeinem Zusammenhang stehen.

Zweifellos verdienen diese Gebilde ein besonderes Interesse. In der Reproduktion werden sie unscharf wiedergegeben; daher sind in Abb. 4e einige vergrößert herausgezeichnet.

III. Besprechung.

Da Hämoglobin in solchen Konzentrationen, wie sie während des Hämolyseprozesses auftreten, den Reaktionsansätzen keine merklichen Mengen Saponin entzieht, kann man — entgegen der Ansicht von Frei[9] und Ponder[2] — seine Anwesenheit für die quantitative Behandlung vernachlässigen. Das ist auch ohne unsere diesbezüglichen Versuche allein aus der Regelmäßigkeit der Hämolysekurven zu entnehmen. Damit würde ein Einwand gegen Schmidt-Thomés[3] Ansicht entfallen. Für eine einheitliche Reaktion des Saponins an den roten Blutzellen spricht ferner die Feststellung, daß durch Änderung des osmotischen Drucks keine wesentliche Änderung des Hämolysegrades bewirkt wird. Das überraschende Ergebnis an erwärmten Zellen wäre dann folgendermaßen zu deuten: Durch die Erwärmung wird die Zahl der „Zellen" erheblich vermehrt und es werden damit die Gleichgewichtsverhältnisse ebenso verändert, als ob man neue Erythrozyten zugefügt hätte.

Nach der Angabe Schmidt-Thomés, der *einzige* Reaktionspartner des Digitonins an der Zelle sei das Cholesterin derselben — eine Angabe, die uns experimentell gut belegt erscheint —, müssen wir unsere Feststellung eines Gleichgewichts zwischen Hämolysegrad und Saponin-

konzentration ausschließlich auf eine Bindung des Saponins an das Cholesterin der Membran beziehen. Als Reaktionspartner dient das Cholesterin der Membran. Das Ergebnis der (übrigens reversiblen) Anlagerung ist eine vielleicht nur lokale Permeabilitätsänderung, die zum Anlaß der osmotischen Schwellung und folgenden Hämolyse wird. Ist mehr Saponin vorhanden, so werden entsprechend mehr Stellen der Membran verändert und die Hämolyse geht schneller. Zu dieser Deutung würde sehr gut passen, daß wir nach der Einwirkung eben hämolytischer Saponinkonzentrationen auf Zellsuspensionen in diesen die meisten Membranen morphologisch unverändert vorfanden. Diese Grenzkonzentrationen bewirken eben keine Membranveränderung über die ganze Zelloberfläche hinweg, sondern nur einen kleinen lokalen, übermikroskopisch im allgemeinen nicht beachteten Effekt. Von gewisser Bedeutung ist, daß mit der von uns gefundenen quantitativen Beziehung jede Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen monomolekularer Saponinbedeckung der Zelle und Hämolyse entfallen muß.

Immerhin mögen zur Erläuterung einige Zahlen angegeben werden. Das Molekulargewicht des Digitonins beträgt etwa 10^3. Im konzentrierten Ansatz von Abb. 1 befinden sich $1{,}06 \cdot 10^{-5}$ g/cm^3, also $\sim 10^{16}$ Moleküle/cm^3 Digitonin. Es befinden sich ferner darin etwa 10^9 Zellen/cm^3. Auf jede Zelle kommen also $\sim 10^7$ Moleküle. Menschliche Zellen enthalten 1—2,3 mg Cholesterin je Kubikzentimeter Zellen, d. h. mindestens $0{,}26 \cdot 10^{-5}$ Moleküle je Kubikzentimeter Zellen. Da im Kubikzentimeter etwas mehr als 10^{10} Zellen vorhanden sind, erhält man unter Berücksichtigung der Lochschmidtschen Zahl (zu rund 10^{24} genommen) etwa $3 \cdot 10^8$ Cholesterinmoleküle je Zelle. Auch wenn man bedenkt, daß laut Abb. 1 bei einem Mengenverhältnis von $\sim 10^7$ Digitoninmolekülen je Zelle mit $3 \cdot 10^8$ Cholesterinmolekülen nur etwa 50% der Zellen hämolysieren, so ist der Abstand zwischen Zahl der Digitonin- und Cholesterinmoleküle viel zu groß, als daß an eine quantitative Reaktion im Sinne einer Bedeckung der Zelle gedacht werden könnte. Die Saponinwirkung muß lokal, nicht über die ganze Zelloberfläche hinweg generalisiert, zustande kommen.

Solange wir nichts über den Einbau des Cholesterins in die Zellmembran wissen, ist es uns nicht möglich, eine weitergehende Aussage über die vorliegende Umsetzung zu machen. Während anscheinend Saponine und Cholesterine in vitro relativ feste Additionsverbindungen geben, scheint die von uns beobachtete Anlagerung an Zellmembranen zunächst noch lose zu sein. Auch die quantitativen Verhältnisse (quadratische Abhängigkeit) sprechen für Besonderheiten der Bindung.

Kommen nun größere Saponinkonzentrationen an die Zelloberfläche, so tritt jene eigentümliche Schüppchenbildung auf. Es war uns mit Hilfe eines Polarisationsmikroskopes nicht möglich festzustellen, ob jene Gebilde Doppelbrechung besitzen; dazu sind sie zu klein. Auf Grund ihrer übermikroskopischen Struktur kann man sie wohl auch kaum als kristallin bezeichnen. Da diese Gebilde nach Ablösung der

Lipoide von der Zellmembran mittels Gallensäure nicht mehr auftreten, könnten es Lipoide sein. Durch die Anlagerung des Digitonins an das Saponin würde es also zu einer Strukturierung — Ablösung oder Aufsplitterung? — der die Zelle bedeckenden Lipoidschicht kommen. Die Größe dieser Schüppchen läßt sich aus unseren Abbildungen entnehmen. Sie sind meist 30—100 mμ breit und 100—500 mμ lang. Es ist bei diesen Dimensionen verständlich, wenn man sie im Dunkelfeld als feine leuchtende Bestäubung an den Zellen sehen kann.

Sehr interessant ist auch die der Schüppchenbildung folgende Schrumpfung der Membranen, bei der es sich um eine echte Denaturierung des Stromaeiweißes handelt. Da diese nur bei Gegenwart eines Saponinüberschusses beobachtet werden kann, möchten wir sie einer Weiterreaktion des überschüssigen Saponins mit dem Stromaeiweiß zuschreiben.

Schließlich bleibt noch die eigentümliche Differenz zwischen den elektronenoptischen Befunden Schmidt-Thomés und unseren eigenen Beobachtungen zu klären. Sie dürfte ihre Grundlage in dem verschiedenen methodischen Vorgehen finden. Schmidt-Thomé präpariert seine Membranen nur aus physiologischer NaCl. Wir haben die Erfahrung gemacht, daß dabei eine große Menge Material verlorengeht und die Zellen zerstört werden können. Beide Beobachtungen hat Schmidt-Thomé gemacht und auch in seiner Arbeit angegeben. Wenn dann schließlich nur Zelltrümmer und wahrscheinlich (mit seinem Verfahren isoliert) jene Schüppchen übrigbleiben, so ist sein Schluß eines völligen Zerfalls der Membran verständlich. Das Verdienst Schmidt-Thomés, eine für uns sehr wichtige Feststellung, wird dadurch nicht berührt, um so weniger als seine Befunde zu einer Zeit zustande kamen, als die speziellen Präparationsmethoden für das Elektronenmikroskop noch kaum ausgearbeitet waren.

Mit diesen kurzen Hinweisen auf Auswertungsmöglichkeiten unserer Befunde möchten wir abschließen. Wir haben auf Grund dieser Versuche den Eindruck gewonnen, daß sich mit der elektronenoptischen Methode ein ziemlich tiefer Einblick in das Wesen pharmakologischer Primärreaktionen in den bisher praktisch unzugänglichen Fällen eines Angriffs an einer spezifischen Struktur gewinnen läßt. Aber es fehlen uns noch wichtige Grundlagen.

Zusammenfassung.

1. Die quantitativen Beziehungen zwischen Digitoninkonzentration und Hämolysegrad von Suspensionen menschlicher Erythrozyten werden in einem weiteren Konzentrationsbereich durch die Formel $\text{Saponin}^2/\text{Zellenzahl} = K$ gut wiedergegeben, wobei für menschliches Blut und einen Hämolysegrad von 50% K etwa $1—2 \cdot 10^{-19}$ beträgt.

2. Eine Erythrozytensuspension verhält sich gegenüber einer definierten Digitoninsuspension wie ein Kollektiv. Wird log Saponin^2

je Zelle als Merkmalswert verwandt, so läßt sich dieses Kollektiv ohne Schwierigkeit als Normalverteilung mit $s = 0{,}203$ beschreiben.

3. Der Hämolysegrad in Digitonin-Zellmischungen ist vom osmotischen Druck unabhängig, lediglich die Hämolysegeschwindigkeit wird verändert.

4. Durch Erhitzen auf etwa 50° kann die Digitoninresistenz von Blutzellen vermehrt werden. (Diese „Resistenzsteigerung" braucht nicht reell zu sein, sondern kann auch auf der um 48° stattfindenden Abspaltung von Teilen der Erythrozyten beruhen, die im Resistenzversuch einer Steigerung der Zellenzahl entsprechen.)

5. Anwesendes Hämoglobin hat keinen Einfluß auf die Saponinhämolyse.

6. Wird Hämoglobin vor dem Versuch mit der Saponinlösung zusammengebracht, so vermag es nur bei erheblichem Überschuß dessen hämolytische Wirkung herabzusetzen, d. h. einen Teil des Saponins zu binden.

7. Elektronenoptisch ließ sich zeigen, daß zwei Gruppen von Veränderungen an digitoninbehandelten Erythrozytenmembranen, in fast völlig gleicher Weise aber auch an den noch hämoglobinhaltigen Zellen, auftreten.

8. Als erste Veränderung wurde die Ablösung von streifenförmigen Schüppchen von der Zellmembran festgestellt. Diese wurden selten völlig abgetrennt. Die restliche Membran war deutlich ärmer an kontrastgebender Masse.

9. Als zweite Veränderung, die auch zeitlich auf die erste folgte, trat Deformierung und schließlich Schrumpfung der Membran ein. Dabei ließ sich eine wohl einer Denaturierung entsprechende Vergröberung und Auflösung der Membranstruktur festhalten.

10. Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen führt Digitonin nicht zur völligen Auflösung der Zellmembran. Anderslaufende Befunde sind kolloidchemische Effekte des Suspensionsmittels NaCl.

Literatur.

[1] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **245**, 22 (1941). — [2] Ponder, E.: Protoplasma-Monographien, Bd. 6. Berlin: Gebrüder Borntträger 1934. — [3] Schmidt-Thomé, J.: Z. physiol. Chem. **275**, 183 (1942). — [4] Kofler, L.: Die Saponine. Wien: Springer 1924. — [5] Rywosch, D.: Pflügers Arch. **116**, 229 (1907). — [6] Bechold, H.: Münch. med. Wschr. **1921**, 127. — [7] Plattner, F., u. H. Hintner: Pflügers Arch. **224**, 293 (1930). — [8] Meneghetti, E: Biochem. Z. **131**, 38 (1922). — [9] Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917. — [10] Jarisch, A.: Pflügers Arch. **186**, 299 (1921). — [11] Frei, W.: Inaug.-Diss. Berlin 1907. Zit. nach Kofler.

Dr. Fritz Jung, (13a) Würzburg, Pharmakologisches Institut.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 159—172 (1949).

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Chemischen Fabrik Dr. A. Wolff, Bielefeld, und der Anstalt Bethel (Leitender Arzt: Prof. Dr. G. Schorsch).

Experimentelle Studien über die Beziehungen zwischen Schilddrüse und Krampfbereitschaft.

Von

Norbert Gerlich.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. September 1948.)

Beim Morbus Basedow findet sich fast regelmäßig eine allgemeine zentrale Erregbarkeitssteigerung, die in der bekannten Empfindlichkeit, der nervösen Unruhe und dem Tremor zum Ausdruck kommt. Der Unterfunktion der Schilddrüse entspricht dagegen eine Erregbarkeitsminderung, die wir beim Myxödem als Verlangsamung zentral-nervöser Vorgänge und Fehlen der Antriebskraft beobachten. Es ist also denkbar, daß die Funktion der Schilddrüsen nicht nur für die allgemeine zentrale Erregbarkeit, sondern auch für die Krampfbereitschaft des Zentralnervensystems (ZNS) von Bedeutung ist.

Es ist allerdings nicht ohne weiteres anzunehmen, daß die zentrale nervöse Erregbarkeit mit der Krampferregbarkeit des ZNS gleichgesetzt werden kann. Daher war es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Beziehungen zwischen Schilddrüsen und Krampferregbarkeit im Tierversuch genauer kennenzulernen, wobei die Krampfbereitschaft mittels des Elektroschocks ermittelt wurde. Derartige Versuche sind meines Wissens in der Literatur noch nicht bekannt.

Der Morbus Basedow ist im Tierversuch nicht hervorzurufen, jedoch gelingt es, durch Schilddrüsenvergiftung bzw. durch Injektion von Thyroxin, einen ähnlichen Zustand der Hyperfunktion der Schilddrüsen zu erzeugen, ebenso wie durch Schilddrüsenentfernung Bedingungen geschaffen werden, die mit denen des Myxödems des Menschen verglichen werden können. Es fragt sich nun, ob durch Schilddrüsenhormongaben die Krampfschwelle als Maß der Krampfbereitschaft herabgesetzt und durch Schilddrüsenexstirpation die Krampfschwelle erhöht wird, weiterhin, ob möglicherweise Unterschiede im Krampfbild zwischen schilddrüsenlosen, schilddrüsenvergifteten und normalen Tieren feststellbar sind.

Krämpfe pflegt man im allgemeinen entweder durch Pharmaka wie Strychnin, Pikrotoxin, Cardiazol, Coramin, Insulin oder durch den elektrischen Strom, insbesondere den Wechselstrom, hervorzurufen. Wir bedienten uns des Wechselstromes, da mit seiner Hilfe,

bei gleich guter Dosierbarkeit, augenblickliche, rasch vorübergehende Krämpfe zu erzeugen sind. Sie können daher auch in kürzerer Zeit wiederholt werden, als dies bei Anwendung irgendwelcher Pharmaka möglich ist.

Gelingt es, eine Abhängigkeit zwischen Schilddrüsenfunktion und Krampferregbarkeit zu finden, so erhalten wir einerseits einen neuen Einblick in die Bedingungen, die für die Entstehung von Krampfkrankheiten beim Menschen von Bedeutung sein können, andererseits wären durch die neu aufgefundenen Gesetzmäßigkeiten die Grundlagen für eine neue Methode der pharmakologischen Auswertung von Schilddrüsenpräparaten geschaffen.

Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere dienten männliche Meerschweinchen (MS) im Durchschnittsgewicht von 350 g. Das Futter bestand aus Grünfutter, Heu und Hafer. Es wurde in der Zusammensetzung nach Möglichkeit konstant gehalten und war so bemessen, daß alle Tiere vor Versuchsbeginn bei täglicher morgendlicher Wägung ihre Gewichte hielten bzw. nur gering zunahmen. Die Schilddrüsenvergiftung erfolgte durch Sondenfütterung von Rinderschilddrüsen-Azetontrockenpulver mit einem Gesamt-Jodgehalt (organisch gebundenem Jod) von 0,18%, entsprechend DAB VI. Zur Fütterung wurde die jeweilige Dose Schilddrüsenpulver in 2 cm^3, auf 37° C angewärmtem Leitungswasser suspendiert, und nach dem Einfließen durch die Sonde wurden noch 2 cm^3 temperiertes Leitungswasser nachgespült. Die Kontrolltiere, die keine Schilddrüsen-Fütterung erhielten, wurden ebenfalls sondiert und bekamen 2 + 2 cm^3 Leitungswasser. Im Versuch von Abb. 6 wurden die Tiere mit täglich 0,3 mg/300 g MS Thyroxin der Firma Hoffmann-La Roche in 0,6 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Die Schilddrüsen-Verfütterung bzw. die Thyroxininjektionen erfolgten stets nach der morgendlichen Wägung.

Als Maß der Krampfbereitschaft bestimmten wir die Elektrokrampfschwelle als diejenige Wechselspannung (Krampfpotential), die bei konstanter Frequenz und Reizzeit und bei bestimmter Stromstärke gerade eben einen Krampf auszulösen imstande ist. Stromquelle war das Wechselstromnetz von 220 Volt und 50 Hz. Die Spannungsänderung geschah mit Hilfe eines Potentiometerwiderstandes hohen Ohmschen Widerstandes oder eines Spannungstrafos. Die Reizelektroden waren mit Wildleder überzogene Messingkugeln von 0,8 cm Durchmesser, die nach Eintauchen in physiologische Kochsalzlösung fest in die beiderseitigen Vertiefungen der Schläfenbeine des Meerschweinchenkopfes gedrückt werden. Die Tiere wurden zur Reizsetzung durch eine gummi-gepolsterte Zweibacken-Halsmanschette festgehalten, so daß der Kopf unbeweglich war, die Bewegungen des Rumpfes und der Gliedmaßen aber unbehindert blieben. Die Reizsetzung erfolgte durch ein Kontaktpendel bei eingestellter Reizzeit. Die Spannung wurde an einem Voltmeter abgelesen, die Bestimmung der Stromstärke setzte bei kurzen Reizzeiten eine Messung mittels trägheitsloser Instrumente voraus. Abb. 1 gibt das Schema der Meßanordnung wieder.

Zweckmäßigerweise verwendet man besonders bei Spannungsteilung mittels eines Spannungstrafos noch einen Vorwiderstand von mindestens 1000 Ohm. Dann ist nämlich die tatsächlich fließende Stromstärke praktisch nur durch die Dimension der Vorwiderstände festgelegt, so daß Änderungen des Kopfwiderstandes bei Zunahme der Spannung ohne größere Bedeutung sind. Man fängt

bei konstanter Frequenz und fest eingestellter Reizzeit bei jedem Tier mit stets der gleichen Anfangsspannung zu reizen an, z. B. mit 50 Volt. Dieser Wert muß hinsichtlich der Krampfauslösung natürlich unterschwellig sein, er ist aber hinsichtlich einer motorischen Rindenreizung schwellig, so daß am Tier mehr oder weniger heftige Bewegungen ausgelöst werden, die mehr als 6—8 Sek. andauern. Ist das Tier wieder vollständig beruhigt, was man auch durch Auflegen der Hand auf den Rücken des Tieres erreichen kann, so wird nun mit einer 5 Volt höheren Spannung gereizt, also z. B. 55 Volt. Es wird weiter mit jeweils 5 Volt zunehmender Wechselspannung so lange erneut gereizt, bis der Krampfschwellenwert erreicht ist. Nicht nur der Potentialzuwachs soll konstant gehalten werden, sondern auch das Reizintervall, also der zeitliche Abstand von Reiz zu Reiz. Er betrug bei uns 12 Sek. Man soll zweckmäßigerweise so vorgehen, daß der 6., höchstens 7. Reiz krampfschwellig ist. Die genaue Einhaltung der Versuchsbedingungen, insbesondere die Beobachtung des jeweils gleichen Anfangspotentials, des konstanten Potentialzuwachses, des gleichen Reizintervalls und der Reizsetzung bei vollkommen beruhigtem Tiere, ist für die Krampfschwellenbestimmung von größter Wichtigkeit, denn Holzer[1] wies bereits darauf hin, daß ein jeglicher Wechselstromdurchgang durch das ZNS bei Frequenzen von 50 bis 5000 Hz zu Änderungen der Erregbarkeitsverhältnisse, mindestens im Sinne einer Sensibilisierung, Anlaß gibt. Die gemessenen Krampfschwellenwerte können also nur Relativwerte sein und sind nicht etwa als absolutes Maß der Krampfbereitschaft des ZNS aufzufassen. Nach unseren Untersuchungen (Gerlich[2]) eignet sich diese Methode gut zu vergleichenden Krampfschwellenbestimmungen.

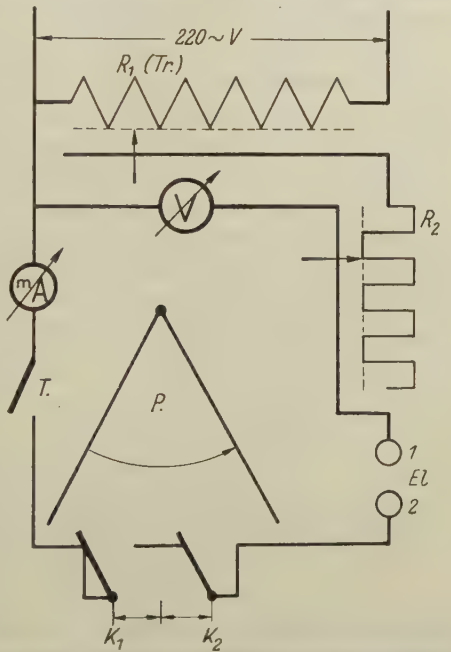


Abb. 1. Schema zur Bestimmung der Elektrokrampfschwelle. $R_1(Tr)$ Potentiometerwiderstand bzw. Spannungstrafo. R_2 Vorwiderstand; P Kontaktpendel mit verstellbaren Kontakten K_1 und K_2 für Reizzeiten von $^2/_{20}$—$^{18}/_{20}$ Sek.; El_1 und El_2 Elektroden; T Schalter.

Die in den Abbildungen wiedergegebenen Werte sind immer Durchschnittswerte der Tiergruppen.

Versuchsergebnisse.

Auch beim MS zeigt der Elektrokrampf bei Querdurchströmung des Kopfes von Schläfe zu Schläfe mit Wechselstrom von 50 Hz einige gut unterscheidbare Stadien. So sieht man für die Dauer des

[1] Holzer, F.: Wien. Arch. inn. Med. **35**, 261 (1941).
[2] Gerlich, N.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. **1947**.

Stromflusses einen generalisierten Spasmus. Bei mittleren Reizzeiten, z. B. $^9/_{20}$ Sek., geht dieser Spasmus mehr oder weniger fließend in eine tonische Phase über. Bei einigen Tieren überwiegt stets der Beugertonus, bei anderen stets der Streckertonus. Daran anschließend folgt ein etwas länger anhaltendes sehr heftiges klonisches Stadium. Werden dabei die Tiere aus der Festhaltevorrichtung herausgelassen, so beobachtet man bei manchen Tieren ein steifbeiniges Aufrichten und schließlich, nach anfänglich langsamem „Stelzgang", ein fluchtartiges Davonrennen, ohne Rücksicht auf im Wege stehende Hindernisse. Für die Dauer des tonischen und klonischen Bildes ist die Pupille starr und erweitert. Fast regelmäßig finden sich unwillkürlicher Harn- und Kotabgang, mitunter auch Ejakulation. Bisweilen beißen sich die MS auch Lippe und Zunge durch, Zähne brechen heraus. Während der tonischen Phase steht die Atmung, der Thorax befindet sich in Inspirationsstellung; während des klonischen Zustandes findet sich zunehmende Preßatmung. Endlich folgt ein komaartiger, erregungsloser Erschlaffungszustand. Die Tiere liegen auf der Seite oder sogar

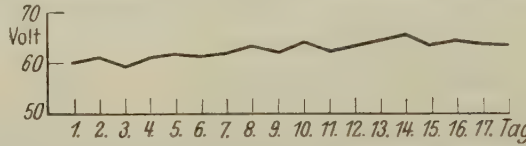


Abb. 2. Durchschnittskrampfpotentiale von 10 männlichen Meerschweinchen im Gewicht von 250—300 g bei täglich einmaliger Elektroschockierung über 18 Tage. Wechselstrom von 50 Hz; Spannungstrafo und Vorwiderstand von 2000 Ohm; Reizzeit $^9/_{20}$ Sek.

auf dem Rücken. Die Dauer der tonischen und klonischen Phase beträgt bis zu 1 Min., die des Erschlaffungsstadiums bis zu 5 Min.

Elektroschockiert man männliche MS an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen täglich einmal, z. B. bei einer Reizzeit von $^9/_{20}$ Sek. (Abb. 2), so findet man keine größeren Schwankungen der Krampfpotentiale. Es läßt sich somit zeigen, daß die Krampfschwelle, und damit die Krampfbereitschaft, eine für das ZNS nicht sehr variable Größe darstellt, eine Erkenntnis, die für unsere Untersuchungen insofern von Bedeutung ist, als die zu beobachtenden Änderungen der Krampfpotentiale, die größer sind als die normalerweise darstellbaren, nicht etwa mehr oder weniger zufällige Schwankungen sind, sondern direkte Wirkungen oder indirekte Folgen der Experimente.

Die Wirkung experimenteller Schilddrüsenvergiftung auf Krampfschwellen und Krampfbild.

In der ersten Versuchsreihe untersuchten wir die Wirkung verschiedener Dosen von Schilddrüsen-Azetontrockenpulver auf die

Krampfpotentiale männlicher MS. Dabei wird die Reizzeit bei allen Tiergruppen konstant gehalten (Abb. 3).

Die Abb. 3 zeigt, daß eine Schilddrüsen-Hormonvergiftung nach einer für Schilddrüsen typischen Latenzzeit von mindestens 2 Tagen zu einem Absinken der Krampfschwellen, also zu einer Krampfbereitschaftssteigerung, führt. Die Krampfpotentiale fallen bei allen 3 Dosen rascher als die entsprechenden Körpergewichte, und zwar ebenfalls

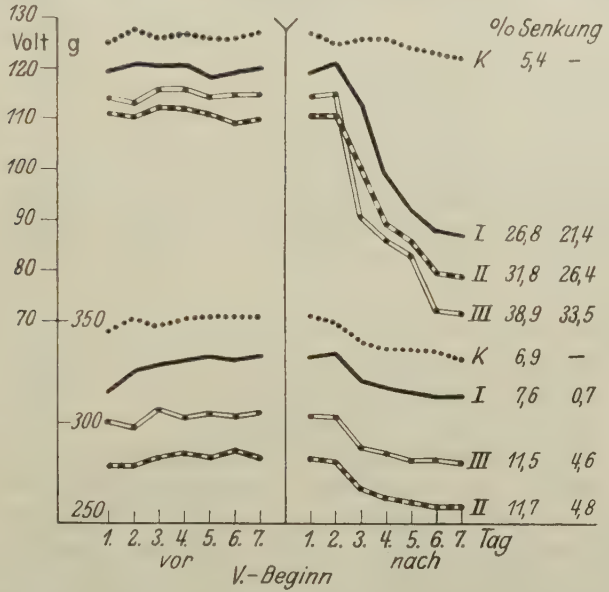


Abb. 3. Wirkung verschiedener Schilddrüsengaben auf die Elektrokrampfschwelle von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale (obere 4 Kurven) und Durchschnittsgewichte (untere 4 Kurven) von je 10 männlichen Meerschweinchen. *K* Kontrollgruppe, täglich Elektroschock, keine Schilddrüse. *I* täglich Elektroschock, täglich über 7 Tage 10 mg/200 g Meerschweinchen Schilddrüsen-Azetontrockenpulver. *II* wie *I*, aber täglich 30 mg/200 g Meerschweinchen Schilddrüsenpulver. *III* wie *I* und *II*, aber täglich 50 mg/200 g Meerschweinchen Schilddrüsenpulver. Wechselstrom von 50 Hz, Potentiometerwiderstand von 10000 Ohm, Reizzeit $^{8}/_{20}$ Sek. Die erste Prozentsenkung ist bezogen auf den 7. Tag vor Versuchsbeginn der Werte der gleichen Tiergruppe, die zweite Prozentsenkung bezieht sich auf die Werte der Kontrollgruppe.

mit einer Dosenproportionalität. Diese Methode eignet sich also auch zur Darstellung von Schilddrüsen-Wirksamkeit und zeigt eine größere Empfindlichkeit als die entsprechende Gewichtsverlustmethode. Dieses Ergebnis gestattet allerdings nicht auszusagen, ob diese Wirkung des Schilddrüsen-Hormons eine direkte oder indirekte ist. Es sei aber erwähnt, daß auch die sonst üblichen Methoden der Bestimmung von Schilddrüsen-Wirksamkeit durchaus nicht alle spezifisch sind.

Das Elektrokrampfbild wies nach Schilddrüsen-Applikation durchweg bei allen Tieren einige Besonderheiten auf. Der für die Dauer

des Stromdurchganges vorhandene generalisierte Spasmus verlor mit zunehmender Vergiftung an Starrheit. Die tonische Phase des Krampfes war im allgemeinen stärker betont, während das klonische Krampfgeschehen im Vergleich zum tonischen Krampfmoment zunehmend an Heftigkeit einbüßte. Der ganze Krampfablauf war bei fast allen Tieren deutlich matter und schwächer. Dies erscheint uns deswegen verständlich, weil ja bei der Schilddrüsen-Hormonvergiftung die dissimilatorischen Vorgänge im Organismus überwiegen, und damit die beim Krampf umgesetzte zweifelsohne recht beträchtliche Energiemenge trotz reichlich angebotenen Futters nicht bis zum folgenden Krampf wiedergewonnen werden kann.

Untersuchten wir zunächst die Wirkung verschiedener Schilddrüsen-Gaben auf die Krampfpotentiale bei gleicher Reizzeit, so wollten wir in einer zweiten Versuchsreihe zeigen, welchen Einfluß verschiedene Reizzeiten auf die Krampfschwellensenkung und die Gewichtsverluste bei gleichen Schilddrüsen-Gaben ausüben. Die Abb. 4 gibt das Ergebnis wieder (Abb. 4).

Zunächst zeigt sich die uns bereits aus anderen Untersuchungen bekannte Tatsache, daß die Krampfschwellenspannung bei kurzer Reizzeit viel höher als bei längerer Reizzeit liegt. Weiter fällt auf, daß die absolute Krampfschwellensenkung bei kurzer Reizzeit bei gleichen Schilddrüsen-Gaben wesentlich stärker als bei längerer Reizzeit ausfällt. Die prozentualen Krampfpotentialverluste erwiesen sich jedoch bei beiden Reizzeiten als gleich groß. Was allerdings die Gewichtsverluste anlangt, so sehen wir zunächst allgemein, daß trotz gleicher Schilddrüsen-Gaben die Körpergewichtssenkung der elektroschockierten Tiergruppen größer als die der Schilddrüsen-Kontrollgruppe ist, also der Gruppe, die nur Schilddrüsen-Gaben erhielt, aber nicht täglich der Krampfprozedur unterworfen wurde. Die wiederholte Elektroschockierung beeinflußt also die durch Schilddrüsen-Gaben zu erzielenden Körpergewichtsverluste. Der Körpergewichtsverlust der täglich krampfenden schilddrüsenvergifteten Tiere ist also nicht nur auf die Schilddrüsen-Gaben zurückzuführen, sondern offenbar mit durch die wiederholten Krampfprozeduren bedingt. Diese Tatsache ist für die vergleichende Bestimmung von Schilddrüsen-Wirksamkeit durch Elektrokrampf und Gewichtsverlust von erheblicher Bedeutung insofern, als damit ersichtlich ist, daß zum Vergleich der Wirkungen auf Krampfschwellen und Körpergewichtes stets eine Gruppe von Tieren mitlaufen muß, die nur elektroschockiert wird. Interessanterweise ist aus Abb. 4 weiter festzustellen, daß die tiefste Körpergewichtssenkung bei den mit kurzer Reizzeit, also höherer Spannung geschockten Tieren auftritt. Die Annahme liegt nahe, daß die wiederholte kurze aber stärkere Stromeinwirkung den Organismus, besonders

aber den schilddrüsenvergifteten, erheblich mehr in Mitleidenschaft zieht, als der wiederholte länger fließende Strom.

Die Betrachtung der bis jetzt angeführten Ergebnisse läßt uns weiterhin vermuten, daß am schilddrüsenvergifteten Organismus nicht nur die Reizzeit für das Ausmaß der Krampfschwellensenkung von

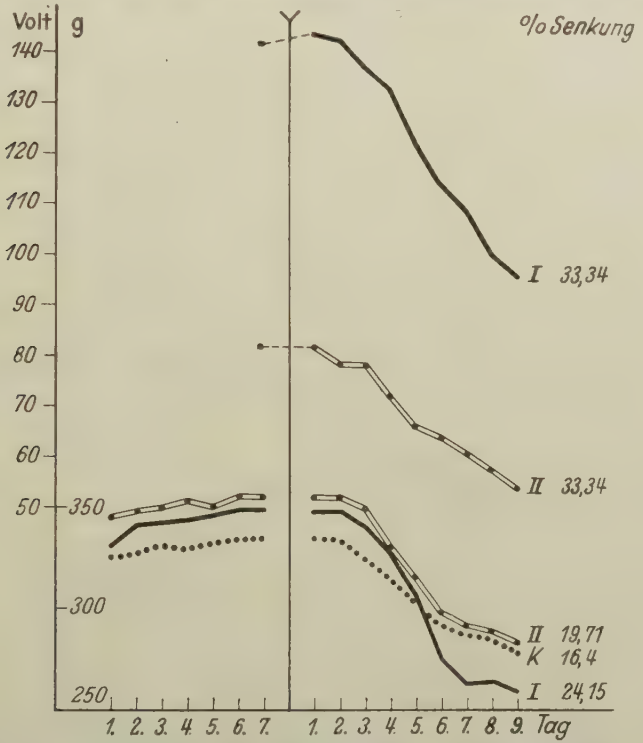


Abb. 4. Krampfschwellensenkung und Gewichtsverluste bei gleichen Schilddrüsengaben aber verschiedenen Reizzeiten. Durchschnittskrampfpotentiale (obere 2 Kurven) und Durchschnittskörpergewichte (untere 3 Kurven) von je 10 männlichen Meerschweinchen. Jede Gruppe erhielt täglich — vom senkrechten Strich (Versuchsbeginn) an — 30 mg/300 g Meerschweinchen Schilddrüsen-Azetontrockenpulver. *K* Kontrollgruppe, nur Schilddrüse ohne Krampf. *I* täglich Schilddrüse und Elektroschock bei $^{6}/_{20}$ Sek. Reizzeit. *II* täglich Schilddrüse und Elektroschock bei $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit. Wechselstrom von 50 Hz, Potentiometerwiderstand von 10000 Ohm. Die Prozentsenkung ist auf die gleiche Tiergruppe bezogen.

Bedeutung ist, sondern auch die täglich wiederholte Elektroschockierung. Um dies näher zu untersuchen, werden bei gleichen Schilddrüsen-Gaben und sonst gleichen Versuchsbedingungen wie bei Abb. 4 zwei Versuchsgruppen nur am 1. und 9. Versuchstage, also in einem Schockintervall von 8 Tagen, elektrogekrampft, die eine Gruppe bei $^{6}/_{20}$ und die andere bei $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit. Im Gegensatz dazu lösten wir bei den beiden anderen Versuchsgruppen bei $^{6}/_{20}$ und $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit täglich den Elektrokrampf aus. Das Ergebnis zeigt die Abb. 5.

Daraus ist ersichtlich, daß sowohl bei der Tiergruppe, die mit kurzer Reizzeit, als auch bei derjenigen, die mit langer Reizzeit bei 8tägigem Schockintervall geschockt wurde, die Krampfschwellensenkungen geringer ausfielen als bei den entsprechenden täglich

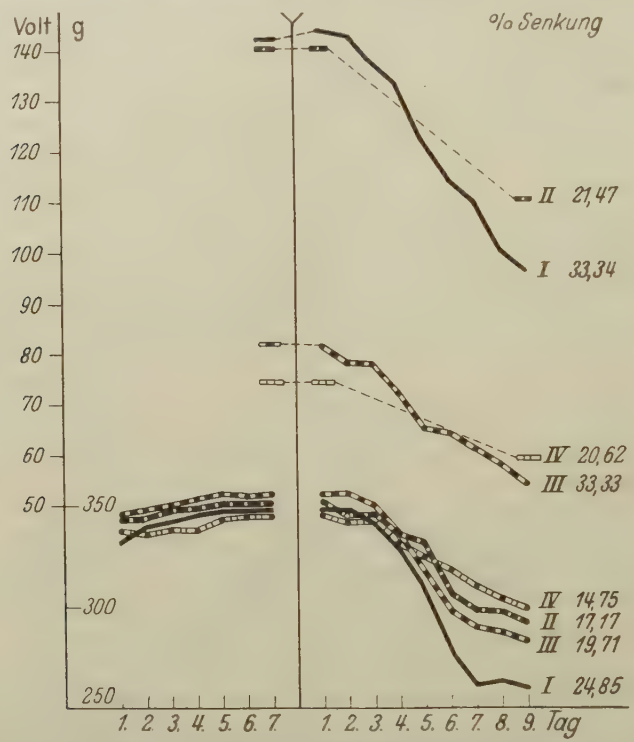


Abb. 5. Krampfschwellensenkung und Gewichtsverluste bei gleichen Schilddrüsengaben, verschiedenen Reizzeiten und verschiedenen Schockintervallen. Durchschnittskrampfpotentiale (obere 4 Kurven) und Durchschnittskörpergewichte (untere 4 Kurven) von je 12 männlichen Meerschweinchen. Jede Gruppe erhielt täglich je 300 g Meerschweinchen 30 mg Schilddrüsen-Azetontrockenpulver. *I* täglich Schilddrüse und täglich Elektroschock bei $^{6}/_{20}$ Sek. Reizzeit; *II* täglich Schilddrüse, aber Elektrokrampf nur bei Versuchsbeginn und Versuchsende (Schockintervall 8 Tage) bei $^{6}/_{20}$ Sek; Reizzeit; *III* täglich Schilddrüse und täglich Elektrokrampf bei $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit. *IV* täglich Schilddrüse aber Elektrokrampf nur zu Versuchsbeginn und Versuchsende bei $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit. Die Prozentsenkung ist jeweils auf die gleiche Tiergruppe bezogen. Wechselstrom von 50 Hz, Potentiometerwiderstand von 10000 Ohm.

krampfenden Tiergruppen. Die prozentualen Krampfschwellenverluste sind auch hierbei praktisch gleich. Die Körpergewichtsverluste der in 8tägigem Schockintervall krampfenden Tiere liegen ebenfalls nicht weit auseinander, während umgekehrt die Körpergewichtssenkungen bei täglich wiederholter Krampfauslösung bei kurzen, starken Strömen erheblich tiefer ausfielen als bei Schockierung in 8tägigem Schockintervall. Es ist also am schilddrüsenvergifteten

Organismus tatsächlich so, daß nicht nur die Reizzeit für das Ausmaß der Krampfschwellensenkung und des Körpergewichtsverlustes bestimmend ist, sondern auch das Krampfintervall. Offenbar führt die wiederholte Krampfauslösung am schilddrüsenvergifteten Tier zu einer zunehmenden Sensibilisierung der Krampferregbarkeit des ZNS im Sinne der Bahnung für Reize gleicher Art. Um diese Frage

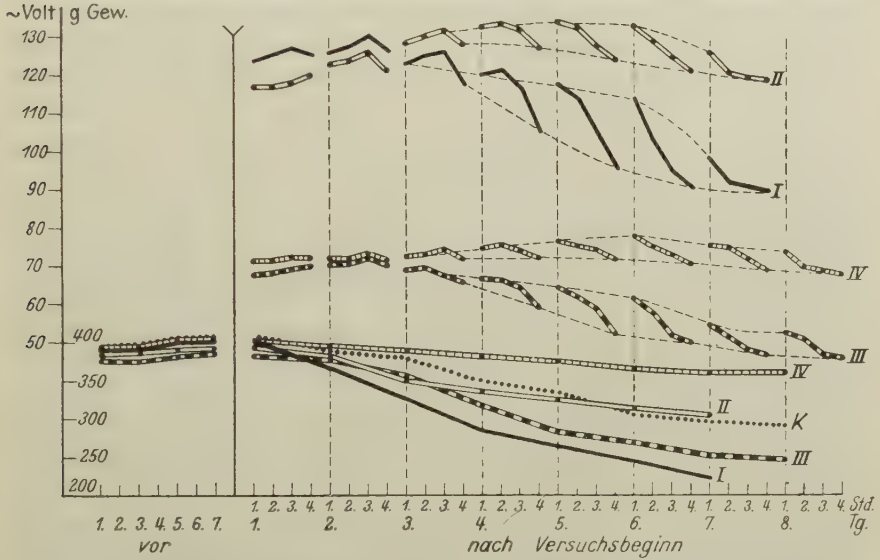


Abb. 6. Krampfschwellensenkung und Gewichtsverluste bei gleichen Schilddrüsengaben, verschiedenen Reizzeiten und täglich viermaliger Elektroschockierung. Durchschnittskrampfpotentiale (obere 4 Kurven) und Durchschnittsgewichte (untere 5 Kurven) von je 10 männlichen Meerschweinchen. Gruppe *I*, *III* und *K* erhielt täglich je 300 g Meerschweinchen 0,3 mg Thyroxin subkutan. *K* Kontrollgruppe, nur Schilddrüse ohne Krampf. *I* täglich Schilddrüse und täglich viermalige, in einstündlichem Abstand erfolgende Elektroschockierung bei $^{6}/_{20}$ Sek. Reizzeit. *II* keine Schilddrüse, täglich Krampfung wie *I*. *III* täglich Schilddrüse und täglich viermalige in einstündlichem Intervall erfolgende Elektroschockierung bei $^{16}/_{20}$ Sek. Reizzeit; *IV* keine Schilddrüse, aber täglich Schockierung wie *III*. Wechselstrom von 50 Hz, Potentiometerwiderstand von 10000 Ohm.

der zunehmenden Sensibilisierung der Krampferregbarkeit des ZNS noch näher zu studieren, schockierten wir in einer weiteren Versuchsreihe bei gleichen Schilddrüsen-Hormongaben bei kurzer und langer Reizzeit die Versuchstiere 7 bzw. 8 Tage lang 4mal täglich in einstündigem Abstand. Bei der großen Versuchstierzahl mußten wir von der sonst angewandten Sondenfütterung Abstand nehmen und dafür Thyroxin (0,3 mg/300 g MS täglich s.k.) injizieren. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 6 wiedergegeben.

Zunächst sehen wir auch hierbei wieder, daß der kurze aber stärkere Strom sowohl beim Normaltier als auch bei dem schilddrüsenvergifteten Tier bei wiederholter Elektroschockierung zu einem

stärkeren Gewichtsverlust führt als der länger fließende aber schwächere Strom. Bei der kurzen Reizzeit ist diese Senkung des Körpergewichts sogar am Normaltier fast so groß wie diejenige der nur mit Thyroxin behandelten Tiere. Es ist dies ein Beweis mehr für die Erfahrung, daß der höher gespannte, wenngleich auch kürzere Zeit fließende Strom einen schädigenderen Einfluß auf den Organismus ausübt als der schwächere, länger anhaltende Strom. Was die Krampfpotentiale anlangt, so sehen wir sowohl bei den Schockkontrollen der längeren und kürzeren Reizzeit, also bei den Tieren, die kein Thyroxin erhielten, aber im übrigen täglich 4mal in einstündlichem Abstand gekrampft wurden, etwa bis zum 6. Tage einen Anstieg der ersten Krampfwerte, zunehmend aber einen Abfall des 2., 3. und 4. Stundenwertes. Diese Erscheinung läßt sich in der Weise erklären, daß offenbar durch das Krampfintervall zwischen dem letzten Tageswert (4-Stundenwert) und dem 1. Tageswert des folgenden Tages, das immerhin 20 Stunden beträgt, eine gewisse Desensibilisierung, im übrigen aber trotzdem innerhalb der Tages-Krampfprozeduren eine Sensibilisierung, stattfindet, die sich in einem zunehmenden Abfall der Tages-Krampfschwellen äußert. Bei den thyroxinvergifteten Tieren, die ebenfalls über 7 bzw. 8 Tage täglich 4mal krampfen mußten, finden wir in den ersten beiden Tagen, also während der Latenzzeit der Schilddrüsen-Wirkung, eine entsprechende Desensibilisierung, im weiteren Verlauf der Vergiftung aber eine zunehmende Sensibilisierung. Sie war wesentlich stärker als bei den Schockkontrollen. Beachtenswerterweise verläuft in den letzten 2—3 Tagen die Kurve der 4-Stunden-Krampfwerte nahezu horizontal. Eine weitere Krampfschwellensenkung als unter einen bestimmten Prozentsatz ist durch Schilddrüsen offenbar nicht zu erzielen. Dies würde bedeuten, daß auch die Sensibilisierung der Krampferregbarkeit des ZNS am schilddrüsenvergifteten Organismus etwa am 6. Tag ihren größtmöglichsten Wert erreicht hat. Weiter sahen wir als Ausdruck des stärker schädigenden Einflusses der wiederholten kurzen, starken Stromeinwirkung eine bedeutend größere allgemeine Schwäche der thyroxinvergifteten Tiere. So starben am 6. Versuchstag von den 10 thyroxinvergifteten Tieren der mit kurzer Reizzeit schockierten Gruppe bereits 2, im Verlaufe des 7. Tages weitere 4 und am 8. Tage die restlichen 4 Tiere. Bei den thyroxinvergifteten Tieren, die mit langer Reizzeit wiederholt gekrampft wurden, beobachteten wir hingegen erst am 8. Versuchstag einen Todesfall. Am 9. Tag starben 2 weitere Tiere, der Rest überlebte den Versuch. Im ganzen erwiesen sich diese Tiere als lange nicht so mitgenommen wie die der kurzen Reizzeit. Es muß betont werden, daß alle die Tiere, die nur Thyroxin erhielten und nicht krampften, den Versuch überlebten. Die beobachteten Todesfälle sind also nicht auf die Thyroxinvergiftung

zu beziehen, sondern als Folge der Einwirkung der wiederholten Krampfauslösung am schilddrüsenvergifteten Organismus aufzufassen. Interessanterweise erwiesen sich die Krampfschwellen selbst bei den Tieren, die bereits so stark geschädigt waren, daß mit dem Tod gerechnet werden mußte, als immer noch gut bestimmbar, und lagen niemals tiefer als im Vergleich zu den anderen Tieren der Gruppe erwartet werden konnte. Daraus geht hervor, daß selbst vor dem Tode die Krampferregbarkeit, bzw. Krampfbereitschaft des ZNS nicht über ein bestimmtes Maß zunimmt.

Die Wirkung der Schilddrüsen-Exstirpation auf Krampfschwellen und Krampfbild.

Fanden wir bei der experimentellen Schilddrüsen-Hormonvergiftung bereits eine Beeinflussung der Krampferregbarkeit und des Krampfbildes, so war weiter zu untersuchen, welchen Einfluß die Thyreoidektomie auf die Krampfbereitschaft und möglicherweise auch auf den Krampfcharakter ausübt. Die Krampfschwellen als Maß der Krampferregbarkeit des ZNS wurden nach oben angegebener Methode bestimmt. Die Thyreoidektomie erfolgte unter aseptischen Bedingungen an männlichen MS in Urethannarkose. Über den Erfolg der Schilddrüsen-Extirpation vergewisserten wir uns nach Abschluß des Versuches durch histologische Untersuchungen an Serienhalsschnitten der getöteten Tiere. Zur Auswertung wurden nur solche Tiere herangezogen, bei denen sich im histologischen Bild keinerlei Schilddrüsengewebe mehr fand. Eine Tiergruppe wurde am 4. Tage nach der Operation an täglich einmal elektroschockiert, die andere aber erst am 24., 25. und 26. Tage nach der Thyreoidektomie. Die Abb. 7 zeigt das Ergebnis.

Wir können daraus entnehmen, daß die Tiergruppe 1 bereits am 4. Tage nach der Operation eine Erhöhung der Krampfschwellen aufweist. Nach kurzer geringer Senkung, die aber nicht unter die Anfangswerte geht, steigen die Krampfpotentiale weiter bis zum 19. Tage, um auf dieser Höhe etwa zu sistieren. Der Anstieg erfolgte von durchschnittlich 62 Volt auf 95 Volt. Bei den Tieren, die erst am 24., 25. und 26. Tage nach der Thyreoidektomie elektroschockiert wurden, ist nur ein Potentialanstieg von 14—16 Volt zu verzeichnen. Dieser Potentialzuwachs ist praktisch so groß wie derjenige der Tiere, die bereits am 4. Tage nach der Operation gekrampft wurden. Wir finden im Falle der Thyreoidektomie also bezüglich der Krampferregbarkeit bei täglich wiederholter und einmaliger Krampfauslösung genau das umgekehrte Verhalten wie bei der Schilddrüsen-Vergiftung. Nahmen wir bei der Schilddrüsen-Hormonvergiftung eine bei wiederholter

Elektroschockierung zunehmende Sensibilisierung bei erhöhter Krampferregbarkeit an, so sehen wir beim schilddrüsenlosen Organismus infolge Fehlens des Schilddrüsen-Hormons eine Herabsetzung der Krampfbereitschaft, und unter dem Einfluß der wiederholten Wechselstrom-Krampfauslösung eine zunehmende Desensibilisierung für Reize gleicher Art. Auch am schilddrüsenlosen Tiere übt die wiederholte Krampfauslösung einen Einfluß auf das Körpergewicht aus. So wird die Gewichtszunahme der thyreoidektomierten Tiere unter der wiederholten Krampfauslösung bis zu einem gewissen Grade gehemmt.

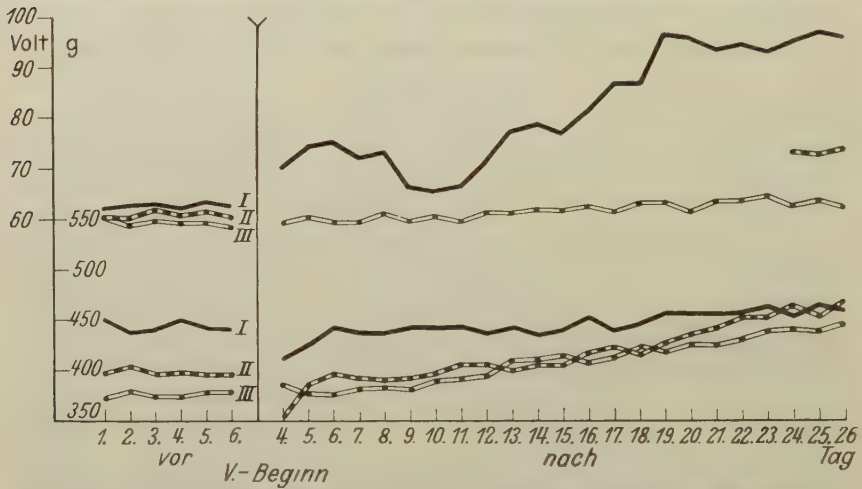


Abb. 7. Einfluß der Thyreoidektomie auf die Krampfschwellen männlicher Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale (obere 3 Kurven) und Durchschnittsgewichte (untere 3 Kurven) von je 10 männlichen Meerschweinchen. *I* täglich einmalige Elektroschockierung vom 4. Tage nach Thyreoidektomie (senkrechter Strich) an; *II* täglich Elektroschockierung vor der Thyreoidektomie, nach der Operation aber erst wieder am 24., 25. und 26. Versuchstag; *III* Normaltiere, die nur täglich einmal elektroschockiert werden. Wechselstrom von 50 Hz, Spannungstrafo, Vorwiderstand von 2000 Ohm, Reizzeit $^9/_{20}$ Sek.

Die Veränderung des Krampfbildes nach Thyreoidektomie ist nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der experimentellen Thyreotoxikose. Das Krampfgeschehen schien auch hierbei im ganzen matter. Die klonische Phase fiel durch eine Verlangsamung und Trägheit auf. Die Amplitude der klonischen Krampfbewegungen war vergrößert. Das tonische Krampfmoment trat dagegen zurück. Es ist also eine gewisse, wenn auch nicht bei allen Tieren deutlich zu beobachtende, Gegensätzlichkeit zwischen den Krampfbildern der Thyreotoxikose und denen nach Thyreoidektomie festzustellen.

Wenn bereits am Anfang nach Beschreibung der Methode der Bestimmung der Krampfschwelle als Maß der Krampferregbarkeit gezeigt werden konnte, daß die Krampferregbarkeit des ZNS offenbar

eine für den Organismus wenig variierende, also charakteristische Größe darstellt, so konnte an Hand einer Reihe von Versuchsergebnissen festgestellt werden, daß die Schilddrüse als innersekretorisches Organ die Krampferregbarkeit zu beeinflussen vermag, d. h. also, daß die Schilddrüse, sicher in Verbindung mit anderen Faktoren, die Krampferregbarkeit des ZNS reguliert. Die Regulation ist daraus zu schließen, daß die Thyreotoxikose zu einer Krampfbereitschaftssteigerung führt, und bei wiederholten Krämpfen noch dazu zu einer zunehmenden Sensibilisierung, während sich das Fehlen des Schilddrüsen-Hormons in einer Herabsetzung der Krampfbereitschaft äußert, und bei wiederholten Krampfauslösungen desensibilisiert. Ob diese Schilddrüseneffekte als direkte oder nur als indirekte Folgen aufgefaßt werden dürfen, läßt sich aus den hier wiedergegebenen Ergebnissen nicht ableiten. Zunächst kam es aber nur darauf an zu zeigen, ob und welche Beziehungen zwischen der Schilddrüse und der Krampferregbarkeit des ZNS, gemessen mit der Elektroschockmethode, bestehen. Diese Frage kann als beantwortet gelten.

Zusammenfassung.

An männlichen MS wird die Krampfschwelle des ZNS als Maß der Krampferregbarkeit bestimmt durch diejenige kleinste elektrische Energiemenge, die bei zu bestimmendem Potential, bestimmter Stromstärke, konstanter Frequenz und Reizzeit gerade eben einen Elektrokrampf auszulösen vermag. Gereizt wurde mit Wechselstrom von 50 Perioden, Reizzeiten von $^{6}/_{20}$, $^{9}/_{20}$ und $^{16}/_{20}$ Sek. und Stromdurchgang von Schläfe zu Schläfe.

Die Krampferregbarkeit ist am Normaltier eine nicht variable Größe.

Auch am MS zeigt der Elektrokrampf deutlich unterscheidbare Stadien: Einleitungsstadium, tonische Phase, klonisches Bild und komaartiger, erregungsloser Zustand. Am schilddrüsenvergifteten und am schilddrüsenextirpierten Tier finden sich Veränderungen des Elektrokrampfbildes.

Die Schilddrüsenvergiftung führt beim MS nach einer Latenzzeit von mindestens 2 Tagen zu einer Zunahme der Krampferregbarkeit. Die Krampfschwellensenkung geschieht proportional der angewandten Schilddrüsendosis, so daß sich diese Methode auch zur Darstellung von Schilddrüsen-Wirksamkeit eignet.

Bei gleichen Schilddrüsen-Hormongaben und verschiedenen Reizzeiten sind die prozentualen Krampfschwellensenkungen doch gleich groß. Die Körpergewichtsverluste erwiesen sich bei kurzer Reizzeit bei täglicher Krampfauslösung als stets größer. Am schilddrüsenvergifteten Tier führt die wiederholte Elektroschockierung, was sich

besonders deutlich bei täglich mehrmaliger Krampfauslösung zeigt, nicht nur zu einer Zunahme der Krampferregbarkeit, sondern noch dazu zu einer zunehmenden Sensibilisierung für Krampfauslösung.

Die Elektroschockierung mit kurzen, starken Strömen ist für den Organismus schädlicher als mit länger anhaltenden schwachen Strömen.

Nach Thyreoidektomie kommt es zu einer Abnahme der Krampfbereitschaft, bei wiederholten Krämpfen noch dazu zu einer Desensibilisierung.

Es kann geschlossen werden, daß sich die Schilddrüsenfunktion offenbar auch in einer Regulierung der Krampferregbarkeit des ZNS äußert. Ob diese Schilddrüsen-Hormonwirkung eine direkte oder indirekte ist, oder ob sie in Verbindung mit anderen endogenen oder exogenen Faktoren erfolgt, bleibt nach den wiedergegebenen Versuchsergebnissen offen.

Dr. N. Gerlich, Bielefeld, Chem. Fabrik Dr. A. Wolff.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 173—202 (1949).

Theoretische und experimentelle Grundlagen der Prothrombinbestimmung unter Berücksichtigung des Prothrombin-Accelerators.

Von

Herm. E. Schultze,

Behringwerke, Marburg, Chemische Abteilung.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 15. Dezember 1948.)

Unter den zahlreichen Faktoren der Blutgerinnung nimmt das *Prothrombin* eine zentrale Stellung ein. Da es chemische Methoden für seine Identifizierung noch nicht gibt, ist man gezwungen, sein „Umwandlungsprodukt", das Thrombin, zu bestimmen. Dieses bewirkt bekanntlich in der

2. Gerinnungsphase

die Überführung von Fibrinogen in Fibrin.

Die theoretische Grundlage der 2. Gerinnungsphase, die eine der empfindlichsten bisher bekannt gewordenen Reaktionen darstellt, kann heute als weitgehend gesichert betrachtet werden. Sie fußt auf der Proportionalität zwischen Thrombinmenge und Gerinnungszeit. Diese wird jedoch nur durch Einhalten bestimmter experimenteller Voraussetzungen gewährleistet:

1. Der mengenmäßig weit überwiegende Reaktionsteilnehmer, das Fibrinogen, muß möglichst rein und frei von Gerinnungsfaktoren sein. Es darf nicht denaturiert sein und muß sowohl in optimaler Konzentration wie bei optimalem p_H vorliegen.

2. Es dürfen keine den Ladungs- und Lösungszustand beeinflussenden Stoffe (Schwermetallionen, polyvalente Ionen, Hydrotropica) und keine Proteinasen (Fribrinolysin, Serumtryptase, Plasmin) zugegen sein.

3. Das angewandte Thrombin muß eine optimale Aktivität* aufweisen und frei von Störungsfaktoren sein.

4. Es muß eine von subjektiven Einflüssen freie Technik zur Erkennung eines charakteristischen Gerinnungspunktes angewandt werden. Die

1. Gerinnungsphase

ist entsprechend den Forderungen der klassischen Gerinnungstheorie[1] durch die „Umwandlung" von Prothrombin in Thrombin in Gegenwart

* Als wirksame Grenzdosis des aktiven Thrombins kann eine Gewichtsmenge angenommen werden, die nur $^1/_{100\,000}$ der umzusetzenden Fibrinogenmenge ausmacht[182].

von Thrombokinase und Ca charakterisiert. Die 1. Phase verläuft viel langsamer als die 2. Phase. Sie kann aber durch überschüssige Mengen von Thrombokinase und Ca erheblich beschleunigt werden. Trotzdem erfordert die völlige „Umwandlung" des im Plasma vorkommenden Prothrombins stets einige Minuten. Die 2. Gerinnungsphase verläuft dagegen bereits in der Größenordnung von Sekunden, wenn nur wenige Prozent dieses Prothrombins in Thrombin überführt sind. Koppelt man beide Reaktionen, indem man die Gerinnungszeit in einer Phase im Plasma bestimmt, so wird die gemessene Gerinnungszeit als Resultante beider Reaktionen im wesentlichen von der geringeren Geschwindigkeit der 1. Phase bestimmt. Diese hängt zwar auch von der vorhandenen Prothrombinmenge ab, analytisch erfaßt wird aber infolge der Verkettung mit der 2. Phase nur der Prothrombinanteil, der innerhalb der beobachteten Gerinnungszeit in Thrombin überführt worden ist. Wählt man nun zur Prothrombinbestimmung eine der wegen ihrer einfachen Ausführung besonders im Kliniksbetrieb weitgehend eingebürgerten *Einphasenmethoden*[2–31], so bestimmt man mit ihnen gar nicht den Prothrombingehalt, sondern diejenigen Faktoren, die die „Umwandlung" des Prothrombins in Thrombin in der 1. Gerinnungsphase beschleunigen, d. h. also, in erster Linie die Aktivität des benutzten Thrombokinasepräparates, oder einen anderen, von der klassischen Gerinnungstheorie noch nicht vorgesehenen Prothrombin-Beschleuniger. Eine einwandfreie Bestimmung des Prothrombingehalts ist nur mit Hilfe einer *Zweiphasenmethode*[32–39] möglich, bei der die vollständige und optimale Überführung des Prothrombins in Thrombin erst abgewartet wird (1. Phase) und das entstandene Thrombin dann in einer neuen Versuchsserie (2. Phase) unter Verwendung von Fibrinogen ausgewertet wird.

Die Richtigkeit der mit der vielbenutzten QUICKschen Einphasenmethode[2–10] erhaltenen Prothrombin-Indexwerte hat besonders RIEBEN[35–37] angezweifelt. Mit Hilfe seiner sehr exakten Zweiphasenmethode findet er unregelmäßige und relativ große Abweichungen zwischen den beiden Methoden schon bei der Ermittlung der menschlichen Normalwerte. Er hält daher nicht nur die theoretischen Voraussetzungen, sondern auch die Methodik des QUICKschen Verfahrens für unzulänglich. Aus den Vereinigten Staaten liegen entsprechende Vergleichsuntersuchungen vor für Normalwerte von Hunden und Kaninchen[40] und für neugeborene Kinder[41], ferner für Defizitwerte von Patienten mit Leberzirrhose[42] und perniziöser Anämie[43]. In allen diesen Fällen liegen die mit der Zweiphasenmethode[32] gemessenen Prothrombinkonzentrationen unter den nach QUICK[2–10] bestimmten Indizes.

Es ist interessant, daß beide Nachweisverfahren für Prothrombin zur Entdeckung neuer Gerinnungsfaktoren geführt haben. QUICK[44–50]

hat bei Anwendung seiner Methode bei der Feststellung von Veränderungen des Prothrombinindex bei Patienten und Hunden nach *Dicumarol*behandlung[51–61] gefunden, daß ein mit *Prothrombin A* bezeichneter Anteil nicht aus dem Plasma verschwindet und aus ihm auch nicht mit $Al(OH)_3$ entfernt werden kann. Er kommt auch im Normalplasma vor und bewirkt eine Herabsetzung der Prothrombinzeit. Beim Lagern ist er nicht stabil. Die nach Dicumarolverabreichung im Plasma verminderte *Prothrombinkomponente B* soll dagegen im gealterten Plasma oder Serum erhalten bleiben. A und B sollen sich beim Vermischen ergänzen, so daß hiernach wieder normale Prothrombinzeiten erhalten werden. Die Befunde Quicks lassen sich nicht in Übereinstimmung bringen mit Ergebnissen der Zweistufenmethode, die schließlich die Isolierung eines Plasmabestandteils ermöglicht haben, der die Aktivierung des Prothrombins durch Thrombokinase + Ca beschleunigt. Die ersten Beobachtungen über einen

Prothrombin-Accelerator

dürften auf C. Owren[62, 63] zurückgehen, der ein Proenzym als 5. Gerinnungsfaktor annimmt, das außer Prothrombin und Thrombokinase bei Anwesenheit freier Ca-Ionen zur Thrombinbildung notwendig ist. Es fehlt bei hämorrhagischer Diathese. Fantl und Nance[64] weisen darauf hin, daß nach Entfernung des Prothrombins mit Hilfe von $BaCO_3$ ein Faktor im Plasma zurückbleibt, der die Thrombinbildung beschleunigt, wenn man ihn einem System aus Prothrombin, Thrombokinase + Ca zufügt. Einen weiteren Beitrag zum Accelerator-Problem geben Beobachtungen von Man und Mitarb.[65], aus denen hervorgeht, daß Extrakte aus Blutplättchen eine stärker beschleunigende Wirkung auf die Bildung von Thrombin aus Gewebsthrombokinase und abgelagertem Plasma ausüben als frisches Plasma oder Serum. Wenn nun Munro und Munro[66] eine unspezifische Reaktivierung des beim Lagern durch eine vermutete reversible Denaturierung geschädigten Prothrombins für möglich halten, so vermag diese Vermutung den jüngsten Forschungsergebnissen von Seegers und Mitarb. nicht standzuhalten. Diesen Autoren ist die Isolierung des nur zu etwa 20 mg-% in Rinderplasma vorkommenden Prothrombins in einem bisher[67–69] unerreichten Reinheitsgrad geglückt[70–73]. Das Reinprothrombin hat die bemerkenswerte Eigenschaft, durch Thrombokinase + Ca sehr viel langsamer zu Thrombin aktiviert zu werden als das rohe Prothrombin[74–75]. Im Plasma kommt somit eine Substanz vor, die den Thrombin-Bildungsprozeß beschleunigt. Sie erhält die Bezeichnung *Accelerator*[76–79] und läßt sich aus Serum und Plasma durch geiegnete Verfahren isolieren. Die neuesten Untersuchungen[74] haben den Nachweis erbracht, daß der Accelerator ein in getrocknetem Zustand haltbares

Globulin ist, das auch *Ac-Globulin* genannt wird. Es hat eine elektrophoretische Beweglichkeit von $-4{,}73 \times 10^{-5}$ in Phosphatpuffer p_H 7,4, kommt im Rinderplasma in einer Konzentration von etwa 0,4—0,5% des Gesamtproteingehalts (= etwa 30 mg-%) vor und ist in konzentrierter Ammoniumsulfatlösung weniger löslich als Prothrombin. Das letztere kann durch 2stündiges Erwärmen auf 53° in rein wäßriger Lösung völlig von Restmengen Accelerator befreit werden[75] — die thermische Zersetzung des Prothrombins beginnt erst bei etwas höherer Temperatur — und stellt in dieser Form ein geeignetes Standardsubstrat für die quantitative Bestimmung beliebiger Acceleratormengen mit der Zweiphasenmethode dar. Die Beschleunigung der Prothrombinaktivierung verläuft nach stöchiometrischen Gesetzen in Abhängigkeit von der Acceleratorkonzentration. Bei der Lagerung von Oxalatplasma bei 5° ist das Ac-Globulin innerhalb 5 Tagen stabil, in gereinigtem Zustand verliert es dagegen seine Aktivität sehr schnell. Es wird von $Mg(OH)_2$ und $Al(OH)_3$ adsorbiert.

Von besonderer Wichtigkeit erscheint die Tatsache, daß der Accelerator auch noch eine Sekundärwirkung auf die *Menge* des in der 1. Gerinnungsphase gebildeten Thrombins ausübt. Das reine Prothrombin ist in wäßriger Lösung bei Zimmertemperatur nur 24 Stunden lang stabil[75]* und infolge der stark verlängerten Aktivierungsperiode ist es zusätzlich schädigenden Nebenreaktionen ausgesetzt**, die zu einer Verminderung der Thrombinausbeute um 50% führen. Auch in Gegenwart geringer Ac-Globulinmengen ist die Thrombinbildung noch nicht vollständig. Eine 100%ige Thrombinausbeute wird erst bei optimalen Ac-Globulinkonzentrationen erreicht, die etwa denen des Normalplasmas entsprechen.

Die engen Beziehungen zwischen Prothrombin und Accelerator sind für die Beurteilung analytischer Befunde bei Rohplasmen von großer Bedeutung. Dies besonders, weil es zur Zeit noch kein einfaches Verfahren zur Trennung von Accelerator und Prothrombin gibt und daher beide Faktoren nebeneinander im nativen Plasma bestimmt werden müssen. Wie bei den bisher am meisten benutzten Prothrombinbestimmungsmethoden[2, 32, 37] ist es hierbei notwendig, von einem Normal-Standard auszugehen. Die nachstehend beschriebene Zweiphasenmethode gestattet nun, Abweichungen von den normalen

* Im Oxalatblut vom Rind ist die Prothrombinaktivität nach 14tägiger Lagerung bei 5° noch zu 90% erhalten[82]. Höchst stabile Prothrombinpräparate werden durch Gefriertrocknung des frischen Oxalatplasmas[37, 82] oder der Reinfraktion[75, 82] erhalten.

** Sehr kleine Thrombinmengen zerstören Prothrombin[75, 80], vgl. auch [81], größere Mengen ermöglichen nach anfänglicher Inaktivierung eine Regeneration des Prothrombins, das in dieser Form Thrombin auch bei Abwesenheit von Thrombokinase, Ac-Globulin und Ca zu bilden vermag.

Accelerator- und Prothrombinmengen sowie Verschiebungen im Accelerator-Prothrombinverhältnis festzustellen. Es geschieht dies durch Messung der Gerinnungszeit (Prothrombinzeit) und der Aktivierungszeit in der gleichen Probe. Beide Bestimmungen sind leicht und schnell durchführbar.

Die Berücksichtigung des Accelerators bei der Durchführung von Prothrombinbestimmungen bedeutet eine Erweiterung der bisherigen diagnostischen Möglichkeit. Sie dürfte sich als nützlich erweisen bei Studien über das Thromboembolie-[54, 121] und Hämophylieproblem[63, 82–86], bei der Entwicklung neuer gerinnungsbenennender Substanzen[87–95] und als Leberfunktionstest[18, 37]. Im letztgenannten Falle ist der Einfluß des Vitamin K zu berücksichtigen[96–101].

Thrombokinase — Ca.

Um Veränderungen des Prothrombin- und Accelerator-Spiegels mit genügender Sicherheit analytisch erfassen zu können, ist der Beschaffenheit des in der 1. Gerinnungsphase benutzten Thrombokinasepräparates besondere Beachtung zu schenken. Grundsätzlich sollen kinasehaltige Gewebsextrakte bzw. Frauenmilch[14, 102] zwar in ausreichender Menge, aber nicht in unnötig großem Überschuß angewandt werden, da die Gefahr des Einschleppens von Accelerator, Prothrombin und Antithrombin besteht und es vielmehr darauf ankommt, leicht meßbare und sicher reproduzierbare als erzwungen kurze Gerinnungszeiten zu erhalten. Durch geeignete Plasmaverdünnung und entsprechende Abstimmung der Thrombokinasemengen gelingt es, die Gerinnungs- und Aktivierungszeiten normaler Plasmen — als Standardwerte — so einzustellen, daß nicht nur Verlängerungen, sondern auch etwaige Verkürzungen bei pathologisch veränderten Plasmen deutlich in Erscheinung treten. Der von Quick und Honorato[50, 103–105] in Lungenextrakten nachgewiesene, gerinnungsbeschleunigende Co-Faktor des Thromboplastins scheint mit dem Accelerator identisch zu sein. Zu seiner Entfernung bedienen sich Ware und Seegers[75] des von Chargaff und Mitarb.[106–112] zur Reinigung des „thromboplastischen Proteins“* ausgearbeiteten Sedimentationsverfahrens (48000 Umdr./Sek.). Einfacher ist es allerdings, den Accelerator durch Erhitzen des Thrombokinasepräparates auf 55° zu zerstören, wobei nach Rieben[37] gleichzeitig Verunreinigungen von Prothrombin und Antithrombin[113] vernichtet werden. Für eine zusätzliche Berücksichtigung gerinnungsfördernder Phospholipoide[114, 115] oder der

* Die bisher reinste Thrombokinase von Chargaff[112] ist ein hochmolekulares Lipoprotein, das bei der Thrombinbildung nur als Katalysator wirkt und bei Abwesenheit des Accelerators in einer Menge von 1 γ 15 γ reines Prothrombin von Ware und Seegers[75] in 20 Min. bei Anwesenheit von Ca zu aktivieren vermag.

Prothrombokinase MILSTONFS[116] durch Einschaltung einer 3. Gerinnungsstufe liegt, wenigstens für die hier erörterte Zielsetzung, keine Notwendigkeit vor. Ebenso erscheint bei der Verwendung von Hirnthrombokinase eine besondere Beseitigung „antithromboplastisch wirkender Substanzen"[117–119] als nicht erforderlich.

Da außer Prothrombin und Thrombokinase auch die Ca-Ionen sich in stöchiometrischen Mengen bei der Thrombinbildung beteiligen[115, 120], ist auch bei ihrer Dosierung auf einen Überschuß zu achten.

Serumproteinase und 2. Gerinnungsphase.

Außer den bisher erwähnten Faktoren ist das im Plasma vorkommende *Fibrinolysin*[121–124] (Plasmatrypsin[125], „lytischer Faktor"[126], Plasmin[127, 128], Tryptase[129, 154]) mit dem Gerinnungsvorgang direkt oder indirekt in Zusammenhang gebracht worden. Auf eine fibrinolytische Aktivität des Thrombins weist die nach erfolgter Gerinnung einsetzende Lyse des Fibrins hin. Der Vorgang steht in auffallender Parallele zur Wirkungsweise gewisser proteolytischer Fermente (Kathepsin[130], Papain[131, 132], mancher Schlangengifte[131], Staphylokokkenkoagulase[133]), die ebenfalls ibrinogen in Fibrin zu überführen und proteolytisch abzubauen vermögen. Schließlich werden die engen Beziehungen zwischen dem gerinnungsauslösenden (thrombischen) und dem proteolytischen Wirkungsvermögen noch durch einige neuere Befunde gestützt, nach denen die fibrinolytisch aktive Serumproteinase[134–142] wie Thrombin in einer inaktiven Vorstufe vorkommt (Profibrinoiysin[124, 143–147], Plasminogen[127, 128, 148, 149]) und durch eine Antiproteinase gehemmt wird (Antifibrinolysin[146], Antiplasmin[127, 128], Trypsin-Inhibitor[150–155]), die zugleich gerinnungshemmend wirkt[129, 152, 158*]. Es ist somit verständlich, daß die Aufdeckung dieser Zusammenhänge der von ALEXANDER SCHMIDT[175] aufgestellten Fermenttheorie des Thrombins ständig neue Anhänger zugeführt hat[57, 130, 165, 176–180].

Es darf aber andererseits nicht übersehen werden, daß bei mit besonders reinen Fibrinogenpräparaten durchgeführten Untersuchungen sich Möglichkeiten für die Trennung von Thrombin und Fibrinolysin ergeben haben[181]; nachdem sich weiter gezeigt hat, daß Fibrinolysin (bzw. Profibrinolysin oder Plasminogen) von Fibrinogen und Fibrin bevorzugt adsorbiert wird[128, 137–142, 148, 149, 182, 183], wird man das Auftreten proteolytischer Aktivität außer auf Thrombin in sehr vielen

* Die Aktivierung kann auf verschiedene Weise erfolgen, z. B. durch Chloroform[124, 127, 156–158, 161], eine tierische Gewebsfibrinokinase[147], die Streptokokkenkinase[127, 128, 159–162], manche Heparinpräparate[163], Serumphosphatide[164], Pepton[165, 166], ferner durch besondere Steuerung des vegetativen Nervensystems[168, 169], durch Muskelanstrengungen[170], durch anaphylaktischen Schock[171–173] und durch Narkose[174].

Fällen auf die Benutzung proteinasehaltiger Fibrinogene zurückführen können. Die mit reinen Produkten erhaltenen Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein zweier unabhängiger Effektorensysteme im Plasma, die Thrombin und proteolytisches Enzym in getrennten Reaktionsfolgen bilden. Trotz ihrer gemeinsamen Affinität zu Fibrinogen scheint der Ablauf der 2. Gerinnungsphase ausschließlich durch Thrombin bestimmt zu werden. Eine Störung durch normalerweise vorkommende Fibrinolysinkonzentrationen ist aus reaktionskinetischen Gründen nicht zu erwarten, zumal die bereits von Wöhlisch[1, 184] vertretene Katalysatortheorie des Thrombins durch neuere Untersuchungen, wenn auch in abgewandelter Form, eine Stütze gefunden hat: Ferry und Morrison[182] fassen die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin als einen Polymerisationsvorgang auf, der durch Thrombin katalytisch eingeleitet wird, und zwar vermag 1 Gewichtsteil Thrombin 10^5 Gewichtsteile Fibrinogen zu polymerisieren*.

Für die praktische Durchführung von Prothrombinbestimmungen ist es trotz vorstehender Erörterungen zu empfehlen, möglichst reine Fibrinogenpräparate zu verwenden, weil bereits mehrfach über eine thrombinzerstörende Wirkung der Serumtryptase berichtet worden ist[154, 195–197] und weil Fibrinolysin die Stabilität des Fibrinogens beeinträchtigt. Außerdem ist die Verwendung von Reinfibrinogen für die exakte Bestimmung des Erstarrungspunktes von Vorteil.

Serumproteinase und 1. Gerinnungsphase.

Wenn im vorstehenden ein Einfluß von Serumproteinase auf den Polymerisationsvorgang des Fibrinogens in Frage gestellt worden ist, so muß andererseits mit einer Einwirkung der Proteinase auf die sehr viel langsamer verlaufende 1. Gerinnungsphase durchaus gerechnet werden. Die einschlägigen, zuerst von Eagle[131, 132], dann von Ferguson[154, 195], Feissli[67], Lenggenhager[198] und Milstone[116] gemachten Beobachtungen lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß die Serumproteinase ebenso wie kristallisiertes Trypsin und vereinzelte proteolytisch aktive Schlangengifte einen beschleunigenden Einfluß auf die Thrombinbildung in Gegenwart von Ca ausüben. Dabei scheint ein weitgehender Ersatz der Thrombokinase durch die verschiedenen proteolytischen Fermente möglich zu sein, und es wird sogar vielfach vermutet, daß die Thrombokinase selbst eine Gewebsproteinase ist. Die Feststellungen MacFarlanes[152], daß fibrinolytisches und thrombokinatisches Wirkungsvermögen bei Lungenextrakten weitgehend koordiniert sind und gemeinsam durch den Kunitzschen kristallisierten

* Für die Polymerisation des Fibrinogens sprechen die Ergebnisse jüngster röntgen-[185] und elektronoptischer[186–188] Untersuchungen, sowie chemisch-enzymatische Analysen[189], vgl. auch [190–194].

Trypsininhibitor aus Sojabohnen gehemmt werden, liegen ganz in dieser Richtung. Auch die neuesten Ergebnisse CHARGAFFS[112] über den Mechanismus der mit reinsten Faktoren durchgeführten 1. Gerinnungsphase lassen sich am besten durch die Annahme einer fermentativen Aktivität für die Thrombokinase erklären.

Gegen die Proteinasenatur der Thrombokinase läßt sich allerdings anführen, daß sowohl Fibrinolysin (Serumtryptase[154, 199]), wie Trypsin[131, 132, 195], das letztere in bestimmten Konzentrationen, auch eine zerstörende Wirkung auf das Prothrombin ausüben können. Ferner ist es MILSTONE[116] nicht gelungen, eine proteolytische Aktivität für ein von ihm benutztes Thrombokinasepräparat nachzuweisen.

Wenn somit die Proteinasenatur der Thrombokinase noch nicht als gesichert gelten darf, so empfiehlt es sich doch, bei der Ausführung von Prothrombinbestimmungen den von RIEBEN[37] gemachten Vorschlag zur Vermeidung von Proteinaseeinwirkungen zu übernehmen und die zu untersuchenden Plasmen in der 1. Gerinnungsphase sehr stark (auf das 50fache) zu verdünnen. Hierdurch wird zugleich die für die Bestimmung benötigte Blutmenge so weit herabgesetzt, daß sie sich leicht von einer zur Senkungsreaktion bestimmten Probe abzweigen läßt. Außerdem werden durch die Verdünnung Störungen durch gerinnungsaktive Aminosäuren des Plasmas bzw. Askorbinsäure ausgeschaltet[35, 38, 200–202]. Über die Beziehung des Ac-Globulins zur Serumproteinase scheinen noch keine Veröffentlichungen vorzuliegen. Auch ist noch nicht bekannt, ob der Accelerator proteolytisch aktiv ist.

Heparin.

Der Einfluß des Heparins[203–207] auf den Gerinnungsvorgang ist bekanntlich ein sehr vielseitiger und entspricht der großen Reaktionsfähigkeit seiner stark sauren Gruppen gegenüber Proteinen bzw. basischen Gruppen derselben (vgl. [94, 95, 208, 209]). Seine gerinnungshemmende Wirkung beruht, im Spiegel der klassischen Theorie betrachtet darauf[37], daß es 1. mit Hilfe eines Plasmafaktors ein Antiprothrombin[210], 2. mit Hilfe von Serumalbumin ein sehr wirksames Antithrombin bildet[181, 211, 212] und 3. das Freiwerden von Thrombokinase aus den Blutplättchen verhindert[59]. Außerdem hemmt Heparin die thrombinzerstörende Wirkung der Serumproteinase[125, 195] und des kristallisierten Trypsins[196]. Die Proteinasehemmung dürfte aber unter physiologischen Bedingungen gegenüber der spontan einsetzenden Antithrombinwirkung des Heparins in Gegenwart des Albuminfaktors kaum zur Auswirkung gelangen. Damit ist die Mannigfaltigkeit der Wirkungsweise des Heparins jedoch noch nicht erschöpft, denn nach HALSE[163] wird durch Injektion von Heparin zunächst eine Beschleunigung der Fibrinolyse ausgelöst, die mit sehr kleinen Dosen auch in

vitro nachzuweisen und offenbar ein Vorstadium der kurz darauf eintretenden Gerinnungshemmung ist (vgl. auch [213] und [219]).

Es ist einleuchtend, daß die Antiprothrombin- wie die Antithrombinwirkung bei der analytischen Ermittlung des Prothrombingehaltes im Plasma stark in Erscheinung tritt. Andererseits verschwindet überschüssiges Heparin stets sehr schnell aus der Blutbahn, so daß man im allgemeinen nur physiologische Streuungen zu berücksichtigen hat. Diese werden durch ausreichende Verdünnung des Plasmas daran gehindert, den Ablauf der 1. Gerinnungsphase zu stören. In der 2. Phase tritt jedoch die Antithrombinwirkung des aktiven Heparins selbst bei einer Plasmaverdünnung 1:50 noch deutlich zutage. Nach Rieben[37] ist der mehr oder weniger steile Abfall der Gerinnungszeit, der nach erreichter maximaler Aktivierung einsetzt, ein geeignetes Maß für den in einer Plasmaprobe vorliegenden Antithrombingehalt. Seine Bestimmungsmöglichkeit eröffnet der Zweiphasenmethode eine wertvolle Erweiterung ihres Anwendungsbereiches.

Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß es theoretisch möglich sein müßte, jede Störung des Heparins bei Prothrombinanalysen durch dosierte Zusätze von Protaminen auszuschalten, nachdem die schlagartige Inaktivierung von Heparin durch Salmin und Clupein sowohl in vitro[214, 167] wie in vivo[60] eindeutig festgestellt worden ist.

Experimenteller Teil.

Nachfolgend wird ein Verfahren zur Prothrombinbestimmung vorgeschlagen, das sich sehr eng an die von Rieben[57]* ausgearbeitete Zweiphasenmethode anlehnt. Diese beruht auf dem Prinzip, die aus Plasmaverdünnung 1:50, Thrombokinase, Ca und Veronalpuffer von p_H 7,6 bestehenden Reaktionsteilnehmer der 1. Phase für einige Minuten bei 23° aufeinander einwirken zu lassen, bis Anzeichen für eine optimale Aktivierung (Auftreten eines feinen Fibrinnetzes) erkennbar werden, und dann in einigen, in kurzen Abständen entnommenen und mit Fibrinogen versetzten Proben die Gerinnungszeit bei 37° zu bestimmen. Die gemessene Gerinnungs- und Prothrombinzeit ergibt nach Umrechnung auf Normalprozente den für Vergleichszwecke geeigneten Prothrombinindex.

Im einzelnen sind folgende Verfahrensteile der Riebenschen Methode *übernommen* worden:

1. die Technik der Oxalatplasmagewinnung**;
2. die hohe Plasmaverdünnung von 1:50;

* Die Kenntnis der Riebenschen Arbeiten wurde mir freundlicherweise durch Herrn Dr. Pfannemüller, Med. Klinik der Universität Freiburg, vermittelt.

** *Anmerkung bei der Korrektur:* Neuerdings wird 1 Teil einer 3,8%igen Natriumcitratlösung für 9 Teile Plasma verwandt.

3. die Aktivierung bei p_H 7,6;

4. die Verwendung von Trockenplasma als Prothrombinstandard;

5. die Temperaturgrade, bei der die Aktivierung (23°) und die Gerinnung (37°) durchgeführt werden.

Die vorgenommenen *Abänderungen* und *Vereinfachungen* betreffen folgende Verfahrenspunkte:

1. Das Fibrinogen wird nicht aus der Fraktion I des Rinderplasmas nach dem Verfahren von COHN[139], sondern unter Zugrundelegung der MACCLEANschen[216] Aufarbeitungstechnik hergestellt und in ein stabiles Trockenpräparat überführt. Das klar lösliche, praktisch fibrinolysin- und zitratfreie Produkt enthält etwa 90% Fibrinogen (bestimmt nach MORRISON[183]) und besitzt gegenüber dem von RIEBEN benutzten Präparat den großen Vorteil, daß seine Lösung in physiologischem NaCl ohne zusätzliches Dialysieren und Einfrieren verwendet werden kann.

2. Bei der Bereitung der Thrombokinase-Ca-Lösung nach QUICK[215] aus getrocknetem Kaninchenhirn (graue Substanz aus Menschenhirn* hat bei entsprechender Aufarbeitung eine ebenso aktive Thrombokinase ergeben) wird die Erhitzungszeit verlängert und zur völligen Klärung der Extrakte eine Filtration durchgeführt. Hierdurch wird die Wirksamkeit der erhaltenen Thrombokinaselösung nicht wesentlich vermindert, dagegen aber eine Verbesserung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit einer stets konstanten Aktivität erzielt.

3. An Stelle des Veronal-HCl-Puffers wird der besser haltbare Veronal-Acetat-HCl-Puffer von p_H 7,6[217] für die Aktivierung benutzt.

4. Die Verwendung eines entsprechenden Puffergemisches von p_H 6,7 wird für die 2. Phase vorgeschlagen, da sich gezeigt hat, daß das hier angewandte Fibrinogen in dem auch von HUDEMANN[181] als optimal gefundenen p_H-Bereich von 6,6—7,0 am schnellsten und vollständigsten erstarrt.

5. Da die Gerinnungszeit von der Fibrinogenkonzentration abhängt[181, 218], hat es sich als zweckmäßig erwiesen, eine konstante, in Vorversuchen ermittelte optimale Konzentration von 0,2% bei allen Bestimmungen beizubehalten.

6. Zur Gewährleistung einer möglichst objektiven und unkomplizierten Erkennung des Gerinnungseintritts hat sich ein sehr einfaches Verfahren bewährt, das die Überführung von Gerinnungsproben aus dem Thermostaten auf eine besonders zu beleuchtende und vorzuwärmende Glasplatte vermeidet. Es beruht darauf, daß in das Fibrinogen, Thrombin und Puffer enthaltende Reagensglas eine Glasperle geeigneter Größe eingelegt und sodann in Schrägstellung (Neigungs-

* Ihre Überlassung verdanke ich dem Pathologischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

winkel etwa 15—20°) langsam um seine Längsachse gedreht wird. Bei seitlicher Beobachtung durch die Glaswand eines in den Thermostaten gestellten Becherglases, dessen Wasserspiegel den des Thermostaten um einige Zentimeter überragt, ist ein Verbleiben der Glasperle an der tiefsten Stelle der Bodenwölbung des Reagensglases feststellbar, solange das Milieu des Gerinnungsgutes noch flüssig ist. Im Augenblick der Erstarrung wird die Perle durch das gebildete Fibringel fixiert und vermag dann nicht mehr länger in der Bodenlage zu verharren, sondern wandert mit der Drehbewegung nach oben. Hierbei ist der Vorgang der spontanen Lüftung der Perle vom Boden besonders gut zu beobachten und als charakteristisches Merkmal für erfolgten Gerinnungseintritt anzusehen.

7. Um bei der Durchführung von Prothrombinbestimmungen auch Schwankungen des Acceleratorgehaltes feststellen zu können, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, bei allen Versuchen die Dauer der Aktivierungsperiode zu messen. Da die Erkennung eines feinen, spinnwebenartigen Fibrinnetzes in der 1. Gerinnungsphase Schwierigkeiten macht und Anlaß zu zeitraubenden Wiederholungen gibt, werden in den folgenden Untersuchungen die Proben aus dem Aktivierungsgemisch in regelmäßigem Zeitabstand von 1 Min. entnommen, ohne Rücksicht darauf, ob und zu welcher Zeit eine Gerinnselbildung auftritt. Hierdurch erübrigt sich auch das von Rieben vorgeschriebene Bewegen des Aktivierungsgemisches. Es hat sich gezeigt, daß durch 3—5 Entnahmen aus der Reaktionsmischung der 1. Phase sowohl die Aktivierungszeit wie die optimale Gerinnungszeit der 2. Phase ohne Versuchswiederholung genau bestimmt werden können.

8. An Stelle des von Rieben vorgeschlagenen Verfahrens, den Prothrombingehalt in Indexzahlen auszudrücken, die sich auf normale Prothrombinzeiten beziehen, wird nachstehend ein Auswertungsverfahren unter Verwendung von Aktivitätskurven angewandt.

Reagenzien (Bereitung und Eigenschaften).

1,85%ige K-oxalat-Lösung. Veronalpufferlösung p_H 7,6: 1,471 g Veronalnatrium + 0,971 g Natriumazetat (3 H_2O) in 50 cm^3 dest. H_2O gelöst + 48 cm^3 n/10 HCl, auf 250 cm^3 mit dest. H_2O aufgefüllt *.

Veronalpufferlösung p_H 6,7: 1,471 g Veronalnatrium + 0,971 g Natriumazetat (3 H_2O) in 50 cm^3 dest. H_2O gelöst + 65 cm^3 n/10 HCl, auf 250 cm^3 mit dest. H_2O aufgefüllt *.

$CaCl_2$-NaCl-Lösung: 0,5 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ + 2,14 g NaCl in 250 cm^3 dest. H_2O gelöst.

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Zur Keimfreihaltung wird der Zusatz einiger Tropfen Talnol empfohlen.

Thrombokinase-Ca-Lösung nach QUICK[214]: 40 mg getrocknetes Kaninchenhirn* werden mit Hilfe eines Glasstabes in einem Zentrifugenglas (Inhalt 20—40 cm^3) mit 1 cm^3 physiologischer NaCl-Lösung gleichmäßig verteilt und unter Umrühren mit 3 cm^3 desselben Lösungsmittels verdünnt. Die Suspension wird in ein auf 57° vorgewärmtes Wasserbad gestellt und unter gelegentlichem Nachheizen mit der Sparflamme 30 Min. lang auf 55° Innentemperatur erwärmt. Während dieser Zeit wird die Suspension häufig umgerührt, anschließend wird auf Zimmertemperatur abgekühlt, 4 cm^3 der $CaCl_2$-NaCl-Lösung zugefügt und die Mischung 5 Min. lang umgerührt. Hierauf wird 5 Min. bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und der Abguß durch ein kleines Papierfilter filtriert. Das nur schwach opaleszente Filtrat ist bei Aufbewahrung im Eisschrank (4°) 10 Tage haltbar. Die Haltbarkeit des zur Extraktbereitung dienenden Trockenhirns scheint sich bei Kühllagerung auf viele Monate zu erstrecken. Bis jetzt liegen eigene Erfahrungen für 8 Monate vor, in welcher Zeit die Aktivität von 9 verschiedenen Trockenpräparaten bei Testung mit Trockenprothrombin unverändert geblieben ist. Der Hauptvorteil der hier beschriebenen Extraktbereitung gegenüber anderen Verfahren der Thrombokinaseaufarbeitung beruht nicht auf der Erreichung einer besonders hohen, sondern einer konstanten Thrombokinaseaktivität. Bei etwa 200 hier durchgeführten Untersuchungen mit Extrakten aus 14 verschiedenen Trockenhirnen sind bisher keine Schwankungen der Wirksamkeit feststellbar gewesen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist bei der in allen Versuchen angewandten Menge von 1 cm^3 Extrakt ein ausreichender Thrombokinaseüberschuß gewährleistet. Die in einem weiten Konzentrationsbereich (0,5—1,4 cm^3) feststellbare Konstanz der Aktivierungs- und Gerinnungszeit beweist ferner, daß störende Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Accelerator, Hemmstoffe) nicht vorhanden sind.

Standard-Prothrombin-Präparat. Als solches wird Trockenplasma gesunder Personen benutzt. Seine Verwendung erspart die besondere Entnahme von Normalplasmen für Kontrollzwecke. Die bereits beschriebene, ausgezeichnete Haltbarkeit des Prothrombins im Trockenplasma hat sich auch bei den hiesigen, sich über viele Monate erstreckenden Versuchen bestätigt**. Vor Gebrauch wird von dem kühllagernden Produkt eine seinem Gewichtsanteil im flüssigen Plasma entsprechende Menge von 30 mg abgewogen und in 16,5 cm^3 physiologischer NaCl-Lösung gelöst, wodurch die übliche Plasmaverdünnung 1:50 erhalten wird.

* Von den Behringwerken Marburg a. d. Lahn beziehbar.

** *Anmerkung bei der Korrektur:* Da sich in manchen Trockenplasmen das Prothrombin als weniger gut haltbar erwies, wird neuersings frisch gewonnenes flüssiges Normalplasma für Kontrollzwecke bevorzugt.

Fibrinogenlösung. Die Verwendung eines reinen, hochaktiven und nicht durch Gerinnungsfaktoren verunreinigten Fibrinogens bildet die die wesentlichste Voraussetzung für das Gelingen der Prothrombinbestimmung. Seine Isolierung erfordert Erfahrung auf eiweißchemischem Gebiet und dürfte in einem Klinikslaborium nicht ohne weiteres durchführbar sein. Die Hauptschwierigkeit beruht darin, die sehr labile Nativ-Struktur, an die die Aktivität des Fibrinogens geknüpft ist, bei der Aufarbeitung zu erhalten und darüber hinaus durch schonende Trocknung bis zum Zeitpunkt seiner Verwendung zu konservieren. Das hier hergestellte Trockenfibrinogen* stellt ein schneeweißes, spezifisch sehr leichtes Produkt von seidenartigem Glanz dar, das in Reagensglasabwägungen von 30 mg im Eisschrank bereitgehalten und im allgemeinen im frischgelösten Zustand benutzt wird. Die Auflösung erfolgt in physiologischer NaCl-Lösung, am besten in der Weise, daß der Inhalt eines Röhrchens zunächst mit 2 cm^3 NaCl-Lösung versetzt und mit Hilfe eines Glasstabes unter die Flüssigkeitsoberfläche gestoßen wird, wobei ein Andrücken an die Gefäßwand zu vermeiden ist. Da jede Beeinflussung der Oberflächenstruktur die Löslichkeit beeinträchtigt, wird der Lösungsansatz zunächst ohne Umrühren 5 Min. in den Thermostaten (37°) gestellt und erst nach erfolgter Spontanquellung mit 3 weiteren Kubikzentimetern physiologischer NaCl-Lösung durch Umrühren in Lösung gebracht. Die jeweilige Versuchsmenge von 0,2 cm^3 der völlig klaren Lösung enthält somit 1,2 mg. Reste einer nicht verbrauchten Fibrinogenlösung behalten im verschlossenen Reagensglas unter einem Tropfen Toluol bei Verwahrung im Eisschrank 2 Tage lang ihre volle Wirksamkeit. Nach 3—4 Tagen ist eine geringgradige Verzögerung der Gerinnungszeit feststellbar.

Zur Prüfung auf freie Serumproteinase wird jedes neu hergestellte Fibrinogenpräparat in 0,6%iger Lösung 24 Stunden unter Toluolzusatz auf 37° erwärmt und dann in der üblichen Weise mit Standardprothrombin getestet. Ist die Prothrombinzeit nach dieser Behandlung gegenüber der mit frisch gelöstem Fibrinogen erhaltenen um mehr als 5% verlängert, so wird das betreffende Präparat nicht benutzt.

Der Einfluß der Fibrinogenkonzentration auf die Gerinnungszeit ist nicht sehr groß. Wird die als optimal gefundene Fibrinogenkonzentration von 0,2% um 100% gesteigert, so wird ebenso wie bei Senkung um 100% eine nur 10%ige Zunahme der Gerinnungszeit beobachtet.

Apparatur.

Thermostat für 12 Liter Wasser mit Einstellungsmöglichkeit auf 37—40°, der genügend Raum hat für die Unterbringung von 12 Reagens-

* Von den Behringwerken Marburg a. d. Lahn beziehbar.

gläsern und für einen Glasstutzen von etwa 4 Liter Fassungsvermögen (200 mm ⌀)*. Auf dem Rand desselben wird eine mit einer kleinen Handkurbel versehene, drehbare Führungshülse aus Dünnblech, in die man das obere Ende des die Gerinnungsmischung enthaltenden Reagensglases einschieben kann, mit Hilfe einer Klammer befestigt. Auf dieser sind 2 um 15° geneigte Führungslöcher für den Reagensglashalter befestigt, durch die die gewünschte Schrägstellung des Reagensglases im Wasserbad bewerkstelligt wird**. Die Drehvorrichtung wird von Hand aus betrieben***, nachdem man zur besseren Erkennung des Gerinnungseintritts eine Glasperle von etwa 30 mg in das Gerinnungsröhrchen eingeworfen hat. Die Beobachtung der Gerinnung geschieht seitlich durch die den Thermostaten überragende Seitenwand des Glasstutzens ohne künstliche Beleuchtung. Die Temperatur wird so reguliert, daß sie im Innern des Glasgefäßes 37°† beträgt.

Ein *Wassergefäß* ohne Heizung für die Aufnahme von 2—5 Liter auf 24° temperiertes Wasser, in das die das Aktivierungsgemisch enthaltenden Reagensgläser eingesetzt werden können, falls die Raumtemperatur unter 20° liegt.

Eine *Stoppuhr* zur Messung der Gerinnungszeit.

Eine *Taschenuhr* oder ein *Wecker* mit Sekundenanzeiger für die Registrierung der Aktivierungszeit.

Reagensgläser. Besonders bewährt haben sich die bei Serülen und Venülen benutzten Außenröhrchen 130/12 mm, weil sie eine durchaus gleichmäßige Bodenwölbung besitzen. Da sie randlos sind, passen sie sehr gut in die Führungshülse.

Reagensgläser und *Pipetten* (graduierte 1- und 5 cm^3-Pipetten) müssen peinlichst sauber gehalten werden. Zur Reinigung werden sie am besten gleich nach Gebrauch in 8—10%ige Natronlauge gelegt und vor Gebrauch gut gespült und getrocknet.

---

* Der Wasserstand des Thermostaten wird 50—70 mm niedriger gehalten als der des Glasstutzens.

** Für Entwurf und Überlassung der Drehvorrichtung bin ich Herrn Elektromeister Kniese zu Dank verpflichtet.

*** Neuerdings liefert die Firma F. Kniese, Marbach bei Marburg, einen sehr zweckmäßigen, vom Firmeninhaber selbst konstruierten Gerinnungsmesser (Bodenfläche 220 mm^2, Höhe 18 mm), bestehend aus einem elektrisch heizbaren Thermostaten für Netzanschluß, 2 eingebauten Gestellen für 12 Reagensgläser und einem 700 cm^3 fassenden Becher (100 mm ⌀), einer Beleuchtungseinrichtung und einem kleinen Antriebsmotor für die auf dem oberen Rand des Thermostaten montierte Drehvorrichtung für das Gerinnungsröhrchen.

† Für die von BUGYI[30] vertretene Auffassung, daß das Temperaturoptimum der Blutgerinnung bei 32° liegt, hat sich bei unserer Versuchsdurchführung kein Anhaltspunkt gegeben.

Arbeitsweise.

Die *Blutentnahme* erfolgt bei Menschen aus der Arm-, bei Kaninchen aus der Ohrvene unter Benutzung einer zuvor sterilisierten Rekordspritze für 2 cm³, die 0,2 cm³ an die Gefäßwand verteilte Oxalatlösung enthält. Auf schnelles Durchmischen ist zu achten. Bei Großtieren (Pferd, Rind, Hammel) läßt man das Blut aus einer in die Halsvene eingeführten Kanüle in einen sterilen Meßzylinder unter Umschwenken in so viel Oxalatlösung einfließen, daß die Oxalatmenge ein Neuntel des entnommenen Blutvolumens ausmacht. Bezüglich des Zeitpunktes, zu dem das gewonnene Oxalatblut zentrifugiert werden soll, liegen für Menschenblut folgende Erfahrungen vor: 2, 4 und 6 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrte Blutproben haben dieselbe Prothrombinzeit ergeben, nach 24 Stunden ist sie in manchen Fällen ebenfalls unverändert, in anderen um 5% vermindert gefunden worden. Hieraus ergibt sich für die Klinikspraxis der Vorteil, daß die an einem Tag entnommenen Proben zu einem beliebigen Zeitpunkt desselben Tages gemeinsam zentrifugiert und analysiert werden können. Zentrifugiert wird 5 Min. bei 3000 Umdreh./Min. Das unverdünnte Plasma verhält sich hinsichtlich der Konstanz seiner Prothrombinzeit in den ersten 24 Stunden wie das nichtzentrifugierte Blut. Wird dagegen unmittelbar nach dem Zentrifugieren eine Plasmaverdünnung im Verhältnis 1:50 physiologischer NaCl-Lösung vorgenommen, so ist die Stabilität wesentlich größer, und es treten erst nach 3 Tagen — Lagerung im Eisschrank vorausgesetzt — Abweichungen in der Prothrombinzeit auf, wodurch die gleichlautenden Befunde Riebens[37] vollständig bestätigt werden.

Zur Verdünnung werden 0,2 cm³ Plasma genau abgemessen und zunächst mit 1,8 cm³ physiologischer NaCl-Lösung versetzt. Von der gut durchgemischten Vorverdünnung wird 1 cm³ mit 4 cm³ Kochsalz auf die Endverdünnung von 1:50 gebracht (Schaumbildung vermeiden).

Die zuvor beschriebene Bereitung des Thrombokinase-Ca-Extraktes und der Fibrinogenlösung kann während des Zentrifugierens oder davor erfolgen. Es ist zweckmäßig, unmittelbar vor dem Ansetzen des Aktivierungsgemisches einige (3—5 oder mehr) Abmessungen von je 0,2 cm³ Fibrinogenlösung in randlose Reagensgläser abzufüllen und mit je 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7 und einer Glasperle zu versetzen. Die betreffenden Einmaße werden im Thermostaten auf 37° vorgewärmt.

Zur *Aktivierung* des Prothrombins werden 0,5 cm³ Plasmaverdünnung in ein Reagensglas eingemessen und mit 0,5 cm³ Veronalpuffer versetzt. Die Mischung wird, falls die Raumtemperatur unter 20° liegt, in ein auf 24° vorgewärmtes Wasserbad gestellt. Zugleich mit dem nun vorzunehmenden Zusatz von 1 cm³ Thrombokinase-Ca-Lösung

wird die genaue Zeit unter Benutzung des Sekundenzifferblattes einer Taschenuhr oder eines Weckers abgelesen. Die erste Überführung von je 0,2 cm^3 des Aktivierungsgemisches in eines der vorgewärmten Röhrchen mit Fibrinogenpufferlösung wird normalerweise nach 2 oder 3 Min. bewerkstelligt. Gleichzeitig mit der Zugabe wird mit der freien Hand die Stoppuhr in Betrieb gesetzt.

Zur Bestimmung der Gerinnungszeit wird der Inhalt des betreffenden Röhrchens schnell vermischt und dieses in die Drehvorrichtung eingeschoben. Dieselbe wird aber erst dann in Tätigkeit gesetzt, wenn der zunächst wasserklare Inhalt beginnt, leicht opaleszent zu werden. Von diesem Zeitpunkt an wird langsam gedreht und im Augenblick des Gerinnungseintritts, der an der Lüftung der Glasperle erkennbar ist, mit der freien Hand die Zeit abgestoppt. Es bleibt dabei dem Prüfer überlassen, ob er die Zeit dann abstoppt, wenn die Perle eine viertel oder eine halbe Umdrehung von der Bodenlage aus mitgemacht hat. Wichtig ist nur, daß bei allen Untersuchungen, sowohl bei Normal- wie bei Patientenplasmen, beim gleichen Perlenstand abgestoppt wird.

Tritt im ersten Röhrchen innerhalb von 55 Sek. keine Gerinnung ein, so wird eine zweite Probe von 0,2 cm^3 dem Aktivierungsgemisch entnommen und der vorgewärmten zweiten Fibrinogenabmessung möglichst genau dann zugefügt, wenn gerade 1 Min. seit der Einmessung der ersten Probe verstrichen ist. Die inzwischen arretierte Stoppuhr wird mit der Fertigstellung des zweiten Gerinnungsansatzes erneut eingeschaltet und das zweite Röhrchen zunächst in das Reagensglasgestell des Thermostaten eingesetzt. Macht sich im zweiten Röhrchen das der Gerinnung vorhergehende Opaleszenzstadium eher bemerkbar als im ersten, so wird es mit diesem in der Drehvorrichtung ausgetauscht. Die Gerinnungszeit des zweiten Röhrchens wird an der Stoppuhr, die des ersten Röhrchens am Sekundenzifferblatt der Taschenuhr abgelesen. Nach Ablauf einer zweiten Minute wird das dritte Röhrchen in gleicher Weise angesetzt wie das zweite. Im Normalfalle wird in der Regel im zweiten oder dritten Röhrchen die kürzeste Gerinnungszeit beobachtet, während diese im vierten Röhrchen bereits etwas verlängert ist. Die Gerinnungszeiten werden mit den zugehörigen Minutenwerten der Aktivierungszeiten notiert und der kürzeste Gerinnungswert der Berechnung des relativen Prothrombingehalts zugrunde gelegt.

Bleibt die Gerinnung in den ersten Röhrchen aus — z. B. in pathologischen Fällen oder nach Verabreichung eines Antithrombotikums — so werden die nächstfolgenden Proben nicht in Ein-Minuten-, sondern in größeren Abständen angesetzt. Hat man sich auf diese Weise an das verzögerte Aktivierungsoptimum herangetastet, so werden die Probeentnahmen wieder im Minutentempo gemacht. Es ist wichtig,

daß immer die optimale Gerinnungszeit möglichst genau gemessen wird. Jedesmaliges Neueinschalten der Stoppuhr erleichtert die Sicherheit derartiger Messungen. Nach einiger Übung gelingt es, genaue Ablesungen der Gerinnungszeit auch bei nicht unterbrochenem Lauf der Stoppuhr zu machen. In diesem Falle ist auf besonders präzises Einhalten der Minutentermine beim Einmessen des Aktivierungsgemisches in die Fibrinogenlösung zu achten. Sehr vorteilhaft ist die Verwendung einer Stoppuhr mit zusätzlicher Minutenablesung, weil sie die gleichzeitige Benutzung einer anderen Uhr überflüssig macht.

Ergebnisse.

Die Wirkungsweise des Verfahrens ist aus den nachfolgenden tabellarischen Zusammenstellungen von Versuchsergebnissen zu sehen. Wie bereits erwähnt, zeigt Tabelle 1 den Einfluß des benutzten Thrombokinase-Ca-Extraktes auf den Verlauf der Aktivierung. Daß die mit diesem Präparat erzielte optimale Gerinnungszeit gegenüber den von Rieben angegebenen Normalwerten etwas verlängert ist, wird in Kauf genommen, da der Extrakt auch bei Überdosierung über die Standardmenge von 1 cm³ keinerlei auf etwa vorhandene Gerinnungsfaktoren zurückzuführende Störung des Gerinnungsablaufs verursacht.

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der angewandten Prothrombin- bzw Thrombinmenge. Sie zeigt, daß bei Abstufung der Prothrombindosen dieselben Indexwerte erhalten werden wie bei entsprechenden Abstufungen des aus einer Einzeldosis gebildeten Thrombins, woraus zu entnehmen ist, daß das Prothrombin in einem größeren Konzentrationsbereich unter

Tabelle 1. *Einfluß des benutzten Thrombokinase-Ca-Gemisches auf die Prothrombinaktivierung.*

Prüfung mit *Standard-Trockenplasma,* frisch bereitete Auflösung 1:50 in physiol. NaCl. — *Thrombokinase-Ca-Extrakt* frisch hergestellt, in verschiedenen Mengen mit 0,5 cm³ Plasmaverdünnung versetzt, mit Veronalpuffer p_H 7,6 auf je 2 cm³ Gesamtvolumen verdünnt. — *Fibrinogen* frisch in physiol. NaCl 0,6%ig gelöst, 0,2 cm³ + 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7 + 0,2 cm³ Aktivierungsgemisch.

Thrombokinase + Ca	Aktivierungsperiode in Minuten								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
cm³	Gerinnungszeiten in Sekunden								
0,25			420	190	105		72	*68*	68
0,33		190	53	48	*47*	47	50	50	55
0,50		180	54	*45*	45	47	46	49	55
0,60	54	46	*45*	45	45	46	50	54	
0,80	96	45	45	*44*	46	47	48	50	
1,00	180	47	*42*	44	44	45	47	50	
1,20	45	43	*42*	42	45	44	45	47	
1,40	65	47	*42*	43	43	47	45	46	

den eingehaltenen Versuchsbedingungen im Verlaufe seiner Aktivierung keine Beeinträchtigung durch die im theoretischen Teil der Abhandlung angeführten Störungsfaktoren erleidet. Erst aus diesem hier erbrachten Nachweis ergibt sich eine Berechtigung, die gemessenen Aktivitätswerte des Thrombins in direkte Beziehung zu seiner Vorstufe, dem Prothrombin, zu bringen. Darüber hinaus zeigt Tabelle 2, daß das Abhängigkeitsverhältnis der Gerinnungszeit von der Thrombinmenge — in einem größeren Konzentrationsbereich betrachtet — nicht linear ist. Die einfache Umrechnung der Gerinnungszeit in Prozentwerte des Standards, wie sie sich in der Praxis der Prothrombinbestimmung eingebürgert hat[2, 37], gibt daher keine sehr genauen Anhaltspunkte für

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Prothrombin- bzw. Thrombinmenge.* A Mengenabstufung vor der Aktivierung; B Mengenabstufung nach erfolgter „Umwandlung" des Prothrombins in einer Einzeldosis derselben Plasmaprobe in Thrombin.

A. *Abgestufte Mengen* menschliches Trockenplasma, mit physiol. NaCl auf das 50fache Ausgangsvolumen verdünnt. Aktivierung mit je 1 cm³ Thrombokinase-Ca-Extrakt aus Kaninchenhirn bei 23° nach Auffüllen auf 2 cm³ mit Veronalpuffer p_H 7,6, *gleiche Mengen* (0,2 cm³) des Aktivierungsgemisches zu verschiedenen Zeitpunkten überführt in Mischungen aus je 0,2 cm³ frisch in physiol. NaCl gelöstem Fibrinogen (0,6%ig) + 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7.

B. *Gleiche Mengen* (0,5 cm³) derselben Plasmaverdünnung mit 1 cm³ desselben Hirnextrakts + 0,5 cm³ Veronalpuffer p_H 7,6 wie zuvor aktiviert, *abgestufte Mengen* der aktivierten Thrombinlösung zu verschiedenen Zeitpunkten überführt in Mischungen aus je 0,2 cm³ der obigen Fibrinogenlösung und soviel Veronalpuffer p_H 6,7, wie jeweils zur Auffüllung auf 0,6 cm³ Gesamtvolumen erforderlich ist.

Bestimmung der Gerinnungszeit in beiden Fällen bei 37°, gemessen vom Augenblick der Zugabe des Aktivierungsgemisches zum Fibrinogen bis zu dessen Erstarrung.

A							B						
Plasmaverdünnung cm³	Aktivierungsperiode in Minuten 3	4	5	6	7	Prothrombinindex	Aktivierungsgemisch cm³	Aktivierungsperiode in Minuten 3	4	5	6	7	Prothrombinindex
	Gerinnungszeit in Sekunden							Gerinnungszeit in Sekunden					
0,15			120	*100*	120	45							
0,20			79	*75*	70	59							
0,25		90	69	*66*	66	64	0,10		85	63	*62*	64	68
0,30		69	69	*59*	60	74	0,12		60	59	*58*	58	70
0,35		*55*	52	*50*	56	84	0,14		60	59	*55*	60	80
0,40		49	48	*47*	49	89	0,16		52	50	*49*	60	86
0,45		49	*45*	48	48	93	0,18		45	*44*	45	48	92
0,50		45	*42*	42	45	100	0,20		45	*42*	42	46	100
0,55		42	*40*	40	44	105	0,22		42	*39*	43	45	108
0,60		40	*38*	40	41	110	0,24		41	*38*	41	45	110
0,65	37	*36*	37	38		117	0,26	39	*37*	39	42		113
0,70	38	*35*	36	38		120	0,28	38	*35*	37	38		120

die tatsächlich vorhandenen Prothrombinmengen. Es ist vielmehr erforderlich, eine Aktivitätskurve des Thrombins aufzustellen (Abb. 1) und aus ihr die den Indexwerten entsprechenden Thrombin- bzw. Prothrombingehaltszahlen zu entnehmen.

Da eine Angabe des absoluten Plasma-Prothrombingehaltes in Gewichtsprozenten zur Zeit noch nicht möglich ist, ist man darauf

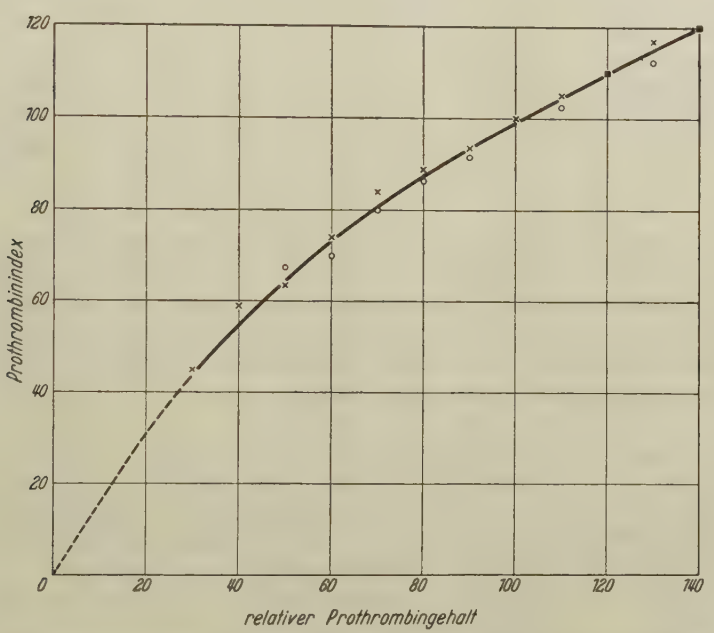


Abb. 1 Aktivitätskurve des Prothrombins. x Abstufungen vor der Aktivierung, o Abstufungen nach der Aktivierung,

angewiesen, einen bei gesunden Personen ermittelten Normalwert als Bezugswert zu verwenden. Die Festsetzung des Standardwertes erfordert jedoch die Sichtung eines größeren Untersuchungsmaterials, da der normale Prothrombingehalt nicht unbeträchtlichen Schwankungen[37] unterworfen ist. Die in Tabelle 3 angeführten Ergebnisse stammen aus einer Untersuchung von 47 Plasmen gesunder Personen beiderlei Geschlechts und verschiedenen Alters, die sich der Blutspenderorganisation der Behringwerke zur Verfügung gestellt hatten*. Wie ersichtlich, kommen bei Normalpersonen größere Abweichungen

* Die Oxalatblutproben wurden freundlicherweise von den Herren Dr. Scholz und Dr. Stuhl entnommen.

Tabelle 3. *Prothrombinzeiten normaler Menschenplasmen.*

Alle *Oxalatblutproben* nach 1—2 Stunden zentrifugiert. Analyse sofort nach dem Zentrifugieren in Verdünnungen 1:50 mit physiol. NaCl. — *Thrombokinase-Ca-Extrakt* frisch hergestellt, zur Aktivierung 1 cm³ mit 0,5 cm³ Plasmaverdünnung und 0,5 cm³ Veronalpuffer p_H 7,6 versetzt. — *Fibrinogen* frisch in physiol. NaCl 0,6%ig gelöst, 0,2 cm³ + 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7 + 0,2 cm³ Aktivierungsgemisch.

Aktivierungsperiode in Minuten												
Gruppe I				Gruppe II				Gruppe III				
	2	3	4		3	4	5		4	5	6	7
Nr.	Gerinnungszeit in Sekunden			Nr.	Gerinnungszeit in Sekunden			Nr.	Gerinnungszeit in Sekunden			
2	140	*42*	42	1	43	*42*	43	5	60	50	*43*	50
16	58	*45*	45	3	48	*41*	41	9	48	*45*	52	
17	65	*45*	45	6	50	*43*	44	36	46	*45*	45	
18	40	*36*	36	8	48	*45*	49	38	42	*40*	43	
19	42	*36*	42	10	72	*40*	46	39	41	*42*	42	
22	57	*45*	45	14	44	*38*	38	40	40	*39*	40	
24	52	*46*	46	15	50	*45*	49	41	42	*39*	42	
25	60	*38*	38	20	50	*43*	45	45	44	*40*	40	
26	44	*38*	38	21	53	*45*	45	47	40	*38*	39	
32	42	*38*	38	27	53	*46*	46		Durchschnitt:			
33	70	*44*	44	28	40	*38*	40		45 6	42	42 2	
34	54	*45*	46	31	41	*38*	41		Gruppe IV			
44	43	*41*	41	35	47	*45*	47					
				37	42	*38*	38	4		52	*50*	50
				42	48	*38*	38	7	54	*48*	50	
				43	58	*45*	47	11		48	*47*	48
				46	40	*38*	38	13	80	*50*	51	
								23	60	53	57	
					Durchschnitt:							
	59	41,4	42,6		48	41,9	42,1		44,3	50,2	51	

der Aktivierungszeit des Prothrombins vor, denen durch Einteilung des Untersuchungsmaterials in verschiedenen Gruppen Rechnung getragen wird. Trotz dieser Schwankungen ist bei der in den Gruppen I—III zusammengefaßten Mehrzahl der Untersuchungsfälle die durchschnittliche Prothrombinzeit bei einer Streubreite von ± 10% nahezu konstant. Es liegt nahe, die vom Prothrombingehalt nicht beeinflußten Unterschiede der Aktivitätszeit — in Anlehnung an die vorläufig auf Rinderplasma beschränkten Entdeckungen des SEEGERSschen Arbeitskreises[76–79] — auf einen verschiedenen Acceleratorgehalt des menschlichen Normalplasmas zurückzuführen, zumal bereits andere Anzeichen[40–50, 62–66] für das Vorkommen des 5. Gerinnungsfaktors auch im Menschenplasma sprechen.

Die verbleibende, nur etwa 10% betragende Minderheit der Untersuchungsfälle ist durch eine verlängerte Prothrombin- und eine ebenfalls verlängerte Aktivierungszeit charakterisiert. Ob diese Fälle mit

gleichzeitig herabgesetztem Prothrombin- und Acceleratorgehalt als völlig normal zu betrachten sind, erscheint fraglich, da vermutet werden darf, daß durch die sehr empfindliche Prothrombinbestimmung selbst geringgradige Störungen der Leberfunktion (Eiweißsynthese) nachgewiesen werden, die unter Umständen das Wohlbefinden nicht beeinträchtigen. Da die Werte der relativ kleinen Restgruppe (IV) auch weit außerhalb der methodischen Fehlerbreite, die nach RIEBEN[37] $\pm$ 2% beträgt, liegen, erscheint es gerechtfertigt, sie bei der Fixierung des Standardwertes nicht zu berücksichtigen und eine Prothrombinzeit von 42 Sek. mit dem Indexwert 100 als Bezugswert festzusetzen. Unter Zugrundelegung dieser Größe ergibt sich für die durchschnittlich verzögerte Prothrombinzeit der Gruppe IV ein Indexwert von $\frac{42 \cdot 100}{50} = 85$ und hieraus unter Zuhilfenahme der Aktivitätskurve (Abb. 1) ein relativer Prothrombingehalt von 76.

Eine Untersuchung des Prothrombingehaltes verschiedener Säugetierplasmen bestätigt die bekannten artspezifischen Schwankungen (Tabelle 4). Der Prothrombingehalt des Kaninchenserums kommt dem des Menschen am nächsten. Der Acceleratorgehalt ist innerhalb der einzelnen Tiergruppen auffallend konstant, so daß die Berechnung von Durchschnittswerten leicht möglich ist. Das Pferd weist den höchsten

Tabelle 4. *Relativer Prothrombingehalt verschiedener Säugetiere.*

Tierplasmen stets 1:50 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Prüfung 1—2 Stunden nach Blutentnahme. — *Thrombokinase-Ca-Extrakt* frisch aus Kaninchenhirn bereitet, 1 cm³ zu 0,5 cm³ Plasmaverdünnung 1:50 + 0,5 cm³ Veronalpuffer p_H 7,6. — *Fibrinogen* frisch 0,6%ig in physiol. NaCl gelöst: 0,2 cm³ + 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7 + 0,2 cm³ Aktivierungsgemisch.

Tierart	Aktivierungsperiode in Minuten								Relativer Prothrombingehalt*
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	Durchschnittliche Gerinnungszeit in Sekunden von Tiergruppen von je 8—14 Individuen								
Hund, normal** . .	39	*35*	38,8						140
Pferd, normal . . .			37,7	*34,2*	35,8				150
Pferd, diphth.-immun			37,5	*34,8*	36,0				143
Pferd, neugeboren***			150,0	*135,0*	135,0				20
Kaninchen, normal .				48,5	*44,5*	47,2			90
Rind, normal					46,8	*45,1*	47,5		89
Hammel, normal . .						66,7	*60,6*	69,7	55
Hammel, diphth.-immun					60,5	*59,1*	63,6		57

* Bezogen auf den menschlichen Standardwert unter Zugrundelegung der Aktivitätskurve.

** Entnahmen freundlichst vermittelt durch Herrn Dr. DRÄGER, Behringwerke.

*** Einzeluntersuchung.

Prothrombingehalt auf, während die bekanntlich schnelle Gerinnbarkeit des Hundeblutes in erster Linie auf einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Prothrombin-Accelerator zurückzuführen sein dürfte. Beim neugeborenen Pferd ist der Accelerator schon in optimaler Menge vorhanden, es besteht aber ein großes Prothrombindefizit.

Auch diesen Beispielen kann entnommen werden, daß das Prothrombin und sein Accelerator selbständige und weitgehende voneinander unabhängige Gerinnungsfaktoren des Säugerblutes sind.

Auffallenderweise wird der Prothrombin- wie der Acceleratorgehalt des Pferde- und Hammelplasmas durch die zur Gewinnung von Immunseren erforderliche Behandlung mit Diphtherietoxin überhaupt nicht beeinträchtigt. Dieser Befund kann jedoch nicht verallgemeinert

Tabelle 5. *Prothrombin- und Aktivierungszeit bei Normal- und Diphtherieimmun-Plasmen vom Rind.*

Normal- und Diphtherieimmun-Plasmen (letztere 7—11 Tage nach der letzten Toxininjektion entnommen), 1:50 mit physiol. NaCl verdünnt. — *Thrombokinase-Ca-Extrakt* frisch aus Kaninchenhirn bereitet, 1 cm^3 zu 0,5 cm^3 Plasmaverdünnung + 0,5 cm^3 Veronalpuffer p_H 7,6. — *Fibrinogen* frisch 0,6%ig gelöst in physiol. NaCl gelöst: 0,2 cm^3 + 0,2 cm^3 Veronalpuffer p_H 6,7 + 0,2 cm^3 Aktivierungsgemisch.

Normal-Rind Nr.	Aktivierungsperiode in Minuten							
	4	5	6	7	8	9	10	11
	Gerinnungszeit in Sekunden							
1	48	*45*	45	54				
2	48	*45*	47	48				
3	50	*46*	47	50				
4	50	50	*45*	45				
5	70	50	*48*	50				
6	45	*41*	41	43				
7	75	53	*42*	42				
8	48	*45*	48	50				
9	54	50	*46*	50				
10	49	43	*42*	43				
Mittelwerte:	53,7	46,8	45,1	47,5				

Diphtherie-Rind Nr.	Gerinnungszeit in Sekunden							
1			120	60	45	*40*	40	40
2				120	64	*41*	41	45
3				100	50	*40*	40	41
4				110	51	41	*40*	41
5				68	45	*38*	40	41
6				48	*41*	45	45	45
7			45	*40*	40	40	44	46
8				60	44	*42*	42	43
9				93	50	*41*	43	43
10				86	54	40	45	48
Mittelwerte:			82,5	78,5	48,4	40,8	42,0	43,3

Wiederherstellung normaler Aktivierungszeit nach Absetzen der Behandlung.

Zeit nach der letzten Toxingabe Tage	Diphtherie-Rind Nr. 9 *							
	Aktivierungsperiode in Minuten							
	4	5	6	7	8	9	10	11
	Gerinnungszeit in Sekunden							
7				93	50	*41*	43	48
9				54	*43*	45	60	61
11				50	46	*41*	45	50
16				50	*44*	47	48	50
21			43	*42*	42	44	48	51
30	50	45	45	45	48	48		

Zeit nach der letzten Toxingabe Tage	Diphtherie-Rind Nr. 10 *							
	Gerinnungszeit in Sekunden							
7				86	54	*40*	45	48
9				53	44	*41*	46	52
11				60	*40*	40	40	46
16				65	*43*	43	47	51
21				52	*43*	43	45	53
30	55	*40*	40	41	45			

* 500 Antitoxineinheiten in Kubikzentimeter.

werden, denn wie Tabelle 5 erkennen läßt, bewirken die bei der routinemäßigen Immunserumgewinnung üblichen Injektionen von Diphtherietoxin beim Rind regelmäßig eine erhebliche Verlängerung der Aktivierungszeit, die auf eine beträchtliche Verminderung des Accelerators hinweist. Nach Absetzen der Behandlung bleibt dieses Ac-Globulindefizit lange bestehen und steigt erst wieder nach 4 Wochen zur Norm an. Es muß also eine erhebliche Störung der Bildung des Acc-Globulins eingetreten sein. Das Prothrombin wird durch das Toxin, abgesehen von einer geringgradigen, vermutlich reflektorisch durch die häufigen Aderlässe ausgelösten Steigerung, nicht beeinflußt.

Die hier beobachtete gerinnungsverzögernde Wirkung des Diphtheriegifts scheint nicht auf das Rinderblut beschränkt zu sein, denn es liegen Befunde von Ströder und Karp[220] vor, nach denen die Gerinnungszeit des Blutes von Kindern bei toxischer Diphtherie ebenfalls herabgesetzt ist (Scharlach, Masern, Keuchhusten, Typhus und andere Infektionskrankheiten bewirken keine Gerinnungsverzögerung). Zur Zeit kann noch nicht entschieden werden, ob die Gerinnungsstörung bei der Diphtherie des Menschen ebenfalls ausschließlich auf eine Verminderung des Acceleratorgehaltes zurückzuführen ist. Nach unseren Beobachtungen beim Rind ist dies jedoch wahrscheinlich. Zur endgültigen Klärung dieser Frage müßte die Zweiphasenmethode herangezogen werden, da weder das Prothrombin noch der Acceleratordurch ein auf dem Einphasenprinzip beruhendes Verfahren exakt bestimmt werden kann.

Tabelle 6. *Einfluß von Dicumarol und Tromexan auf Prothrombin und Accelerator.*

Kaninchen Nr. 1 = 5 mg Dicumarol in Olivenöl, subkutan;
Kaninchen Nr. 2 = 10 mg Dicumarol in Olivenöl, subkutan;
Kaninchen Nr. 3 = 20 mg Tromexan in Olivenöl, subkutan;
Kaninchen Nr. 4 = 40 mg Tromexan in Olivenöl, subkutan.

Normalperson: 8 Tabletten Tromexan = 2,4 g in 48 Stunden oral auf die Mahlzeiten verteilt.

Plasmaproben vor und zu verschiedenen Zeiten nach Verabreichung in Verdünnung 1:50 (physiol. NaCl) untersucht. 1—2 Stunden nach Blutentnahme geprüft. — *Thrombokinase-Ca-Extrakt* frisch aus Kaninchenhirn hergestellt. 1 cm³ zu 0,5 cm³ Plasmaverdünnung 1:50 + 0,5 cm³ Veronalpuffer 7,6. — *Fibrinogen* frisch 0,6%ig in physiol. NaCl gelöst: 0,2 cm³ + 0,2 cm³ Veronalpuffer p_H 6,7 + 0,2 cm³ Plasma-Thrombokinase-Ca-Gemisch.

Zeit nach der Verabreichung Stunden	Aktivierungsperiode in Minuten: 3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	16 — Gerinnungszeit in Sekunden	Relativer Prothrombingehalt*	Acceleratorindex**
Kaninchen 1 (5 mg Dicumarol).													
0	186	*48*	50	53								100	100
16	200	*46*	55	65								108	100
40								110	*102*	103		32	33
68						126	*90*	90	105			38	44
140		75	*60*	65								70	80
Kaninchen 2 (10 mg Dicumarol).													
0	65	50	*44*	44	47							100	100
24						72	*60*	65				60	55
48	Optimale Aktiv.-Zeit 20 Min. Gerinnungszeit *105* Sek.											28	25
72	,,		,,	20	,,			,,		*135*	,,	20	25
168	,,		,,	70	,,			,,		*240*	,,	10	7
192†	,,		,,	80	,,			,,		*2100*	,,	2	6
Kaninchen 3 (20 mg Tromexan).													
0	45	*42*	42	44								100	100
24	360	54	53	*50*	60							75	66
48	40	*38*	40	50								120	133
Kaninchen 4 (40 mg Tromexan).													
0		46	*42*	42	43							100	100
24			420		186	*55*	90					64	63
48					75	*70*	75					45	63
72		45	*41*		45	45						100	125
Normalperson 39 (2,4 g Tromexan).													
0	60	51	*42*	42								100	100
48								95	75	*73*	75	42	33
72			70	*55*	55							65	83
96	95	50	*48*	52	54							80	100

* Bezogen auf den Ausgangswert als Standardwert 100, Gehaltsbestimmung unter Verwendung der Aktivierungskurve (Abb. 1).

** Vergleiche Text.

† Tier kommt nach zwei weiteren Tagen ad exitum.

Daß der Accelerator eine sehr wesentliche Rolle, auch bei der künstlichen Beeinflussung des Gerinnungsablaufs durch antithrombotisch wirksame Substanzen spielt, geht aus einigen Versuchen hervor, die mit Dicumarol[22, 51–61, 221]* und Tromexan* bei Kaninchen und beim Menschen angestellt wurden (Tabelle 6). Sie zeigen, daß diese Substanzen sowohl das Prothrombin wie seinen Accelerator stark vermindern. Die Gehaltsänderungen der beiden Faktoren scheinen aber nicht in allen Phasen der Gerinnungsbeeinflussung parallel zu laufen. Vielmehr macht sich beim Accelerator die Tendenz bemerkbar, im Anfangsstadium stärker abzusinken und im Endstadium schneller zur Norm zurückzukehren als das Prothrombin.

Zur besseren Veranschaulichung werden die Acceleratorschwankungen in dieser Versuchsreihe in Form von Indexwerten ausgedrückt, denen die jeweiligen Aktivitätszeiten der Ausgangsplasmen mit einem Standardwert 100 zugrunde gelegt werden. Dieses noch improvisierte Vorgehen ermöglicht — in Ermangelung eines exakteren Auswertungsverfahrens — eine annähernde zahlenmäßige Abschätzung des Acceleratorgehaltes, für die zur Zeit ein besonderes Bedürfnis vorliegt. Es entspringt dem Wunsch nach einer besseren Charakterisierung der Wirkungsweise gerinnungshemmender Substanzen, bei der außer den klassischen Gerinnungsfaktoren auch der Accelerator zu berücksichtigen ist, wie auch bei der Festlegung der Dosierung die Beachtung nicht nur eines bestimmten Prothrombin-, sondern auch die eines möglichst zahlenmäßig ausdrückbaren Acceleratorschwellenwertes geboten erscheint.

Die hier durchgeführten Untersuchungen lassen keinen prinzipiellen Unterschied zwischen der Wirkungsweise des Dicumarols und der des Tromexans erkennen, bestätigen aber für Tromexan den wesentlichen Vorteil geringerer Toxizität und besserer Dosierbarkeit[90–92]. Nach Absetzung der Behandlung[121] tritt bei Tromexan eine nur geringgradige, sich aber auf das Prothrombin und den Accelerator erstreckende Überproduktion ein.

Zusammenfassung.

Es wird über Forschungsergebnisse berichtet, die in jüngster Zeit zu einer wesentlichen Förderung unserer Kenntnisse auf dem Wege der Blutgerinnung beigetragen haben. Sie betreffen in der Hauptsache die Reindarstellung des Prothrombins, der Thrombokinase und des Fibrinogens sowie die Entdeckung des Prothrombin-Accelerators (Ac-Globulin) als fünften, in der klassischen Gerinnungstheorie nicht vorgesehenen Gerinnungsfaktor.

* Zur Überlassung des Dicumarols bin ich Herrn Direktor Dr. M. Bockmühl, Farbwerke Höchst, und für die des Tromexans der Firma J.R. Geigy, AG., Basel, zu Dank verpflichtet.

Es wird der Versuch gemacht, die neuen Erkenntnisse in Einklang zu bringen mit den praktischen Bedürfnissen der Prothrombinbestimmung. Dabei ergibt sich, daß die von RIEBEN vorgeschlagene Zweiphasenmethode theoretisch besonders gut fundiert ist. Ihre experimentelle Durchführung wird durch Verwendung eines stabilen, reinen und sofort gebrauchsfertigen Trockenfibrinogens, durch einen nicht durch störende Gerinnungsfaktoren verunreinigten Thrombokinaseextrakt und ein von subjektiven Einflüssen weitgehend befreites Verfahren zur Erkennung des Gerinnungseintritts vereinfacht. Durch Aufstellung einer Aktivitätskurve wird die Angabe relativer Prothrombinwerte (bezogen auf den Standardwert des Normalplasmas) ermöglicht. Ferner gelingt es, durch eine geringfügige Modifikation des Verfahrens ohne zusätzlichen Zeitaufwand auch den Acceleratorgehalt derselben Plasmaprobe größenordnungsmäßig zu bestimmen.

Es werden Belege dafür erbracht, daß der Accelerator im Hunde-, Kaninchen-, Rinder- und Menschenplasma als selbständiger Gerinnungsfaktor in Erscheinung tritt. Das neugeborene Pferd weist ein starkes Prothrombindefizit, aber normalen Acceleratorgehalt auf. Durch Immunisieren von Rindern mit Diphtherietoxin wird eine einseitige Verminderung des Acceleratorgehalts ohne Beeinflussung der vorhandenen Prothrobinmengen hervorgerufen. Dagegen wird durch Dicumarol und Tromexan beim Kaninchen und Menschen eine Herabsetzung des Accelerators und zugleich eine, wenn auch nicht parallel laufende Verminderung des Prothrombins ausgelöst. Durch die vielgebrauchte Einphasenmethode QUICKs wird in erster Linie der Acceleratorgehalt und der Prothrombingehalt nur teilweise erfaßt.

Literatur.

[1] WÖHLICH, E.: Erg. Physiol. **43**, 174 (1940). — [2] QUICK, A. I., M. STANLEY-BROWN u. F. W. BANCRAFT: Amer. J. med. Sci. **190**, 500 (1935). — [3] QUICK, A. I.: J. biol. Chem. (Am.) **109**, 73 (1935). — J. Physiol. (Brit.) **118**, 260 (1937). — [4] QUICK, A. I.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **40**, 206 (1939). — [5] QUICK, A. I.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **42**, 788 (1939). — [6] QUICK, A. I.: Amer. J. clin. Path. **10**, 222 (1940). — [7] QUICK, A. I.: J. Physiol. (Brit.) **132**, 239 (1941). — [8] QUICK, A. I.: The Hemorrhagic Diseases, Springfield; Alb., CH. C. THOMAS, **35**, 40 (1942). — [9] QUICK, A. I.: Amer. Rev. Physiol. **6**, 301 (1944). — [10] QUICK, A. I.: J. biol. Chem. (Am.) **161**, 39 (1945). — [11] FIECHTER, N.: Schweiz. med. Wschr. **1940**, 259. — [12] KATO, K.: Amer. J. Chir. Path. **10**, 147 (1940). — [13] PAGE, R. C., u. H. K. RUSSEL: J. Labor. a. clin. Med. (Am.) **26**, 1366 (1941). — [14] FREUDENBERG, E.: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 1256. — [15] CAMPBELL, H. A., W. K. SMITH, W. L. ROBERTS and K. P. LINK: J. biol. Chem. (Am.) **138**, 1 (1941). [16] LEHMANN, I.: Mschr. Kinderhk. **86**, 44 (1941). — [17] LEHMANN, I.: Nordisk Med. (Schwd.) **12**, 3192 (1941). — [18] KOLLER, F.: Das Vitamin K und seine klinische Bedeutung. Leipzig: Georg Thieme 1941. — [19] ROVATTI: Arch. Sci. Med. **1941**, 250. — [20] WITTS, L. I., and F. C. HOBSON: Brit. med. J. **1942 I**, 575. — [21] LEHMANN, I.: Sv. Läkartidn. **1942**, Nr 16. — [22] ARMENTANO u. GÉHER: Orv. Hetil. (Ung.)

1942, 10. — [23] Soulier, J. P.: Soc. franç. Biol. Clin. **26** (1945). — [24] Soulier, J. P.: Sang **7**, 448 (1946). — [25] Jürgens, J.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 24/25, 216. — [26] Lein, I.: J. cellul. a comp. Physiol. (Am.) **30**, 43 (1947). — [27] Wunderly, Ch.: Experientia **3**, 249 (1947). — [28] Kafka, V.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 545. — [29] Neuweiler, W.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 402. — [30] Bugyi, B.: Schweiz. med.Wschr. **1948**, 284, 688. — [31] Thordarson: Nordisk Med. (Schwd.) **5**, 86 (1940). — [32] Warner, E. D., K. M. Brinkhous and H. P. Smith: Amer. J. Physiol. **114**, 667 (1936). — [33] Herbert, F. K.: Biochem. J. (Brit.) **34**, 1554 (1940). — [34] Herbert, F. K.: Chem. a. Ind. **60**, 618 (1941). — [35] Rieben, W. K.: Helvet. med. Acta **13**, 295, 308 (1946). — [36] Rieben, W. K.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 726. — [37] Rieben, W. K.: Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. Basel: Benno Schwabe, 1947. — [38] Rieben, W. K.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 913. — [39] Stamler, F. W., R. T. Tidrick u. E. D. Warner: J. Nutr. (Am.) **26**, 95 (1943). — [40] Warner, E. D., K. Brinkhous and H. P. Smith: Amer. J. Physiol. **125**, 296 (1939). — [41] Owen, C., G. Hoffmann, S. Ziffren and H. P. Smith: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **41**, 181 (1939). — [42] Ziffren, S., C. Owen, E. D. Warner and F. Petersen: Surg. etc. (Am.) **74**, 463 (1942). — [43] Warner, E. D., and C. Owen: Amer. J. med. Sci. **203**, 187 (1942). — [44] Quick, A. I.: Amer. J. Physiol. **140**, 212 (1943). — [45] Oneal, W. I. and C. R. Lane: Amer. J. med. Sci. **1945**, 881. — [46] Quick, A. I.: Amer. J. clin. Path. **15**, 560 (1945). — [47] Quick, A. I.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **62**, 249 (1946). — [48] Quick, A. I.: Proc. Inst. Med. Chicago **16**, 94 (1946). — [49] Quick, A. I.: Lancet **1947**, 379. — Chem. Zbl. **118**, 71. (1947). — [50] Quick, A. I.: J. amer. Physiol. **150**, 405 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 1332 (1948). — [51] Link, K. P. u. Mitarb.: J. biol. Chem. **138**, 1 (1941). — [52] Link, K. P.: J. biol. Chem. (Am.) **156**, 726 (1944). — [53] Rehn, E.: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 595. — [54] Rehn, E., u. K. N. v. Kaulla: Die klinische Lösung des Thromboembolieproblems. Stuttgart: Ferdinand Enke 1947. — [55] Halse, Th.: Med. Klin. **42**, 1 (1947). — [56] Halse, Th.: Med. Klin. **43**, 173 (1948). — [57] Halse, Th.: Klin. Wschr. **1948**, 425. — [58] Halse, Th., u. G. Quennet: Dtsch. med. Wschr. **1948**, 124. — [59] Jensen, J.: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 381. — [60] Jakob, F.: Schweiz. med. Wschr. **1945**, 208. — [61] Neumayr, A., u. I. Schmid: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 616. — [62] Owren, P. A.: The coagulation of blood, investigations on a new clotting factor. Oslo 1947. — [63] Owren, P. A.: Lancet **1947**, 446. — [64] Fantl, P., and M. Nance: Nature (Brit.) **158**, 706 (1946). — [65] Man, F. D., M. Hurn and Th. B. Nagath: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **66**, 33 (1947). [66] Munro, M. P., and F. L. Munro: Amer. J. Physiol. **150**, 409 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 1333 (1948). — [67] Feissly, R.: Schweiz. med. Wchr. **1945**, 696. — [68] Feissly, R.: Helvet. med. Acta **13**, 313 (1946). — [69] Cohn, E. I.: Experientia **3**, 125 (1947). — Vgl. Abaza, A.: Presse méd. **1946**, Nr 44, 604. Cohn, E. I.: Blood **3**, 471 (1948). — [70] Seegers, W. H., H. P. Smith, E. D. Warner and K. M. Brinkhous: J. biol. Chem. (Am.) **123**, 751 (1938). — [71] Seegers, W. H.: J. biol. Chem. (Am.) **136**, 103 (1940). — [72] Seegers, W. H., and H. P. Smith: J. biol. Chem. (Am.) **140**, 677 (1941). — [73] Seegers, W. H., E. C. Loomis and I. M. Vandenbelt: Arch. Biochem. (Am.) **6**, 85 (1945). — [74] Ware, A. G., and W. H. Seegers: J. biol. Chem. **172**, 699 (1948). — [75] Ware, A. G., and W. H. Seegers: J. biol. Chem. (Am.) **174**, 565 (1948). — [76] Ware, A. G., M. M. Guest and W. H. Seegers: Sciene (N. Y.) **106**, 41 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 1332 (1948). — [77] Ware, A. G., R. C. Murphy and W. H. Seegers: Science (N. Y.) **106**, 618 (1947). — [78] Ware, A. G., M. M. Guest and W. H. Seegers: J. biol. Chem. (Am.) **169**, 231 (1947). — Chem. Zbl. **118**, 1675 (1947). — [79] Loomis, E. C., and W. H. Seegers: Amer. J. Physiol. **148**, 563 (1947). — [80] Mertz, E. T., W. H. Seegers and P. H. Smith: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **41**, 657 (1931). — [81] Ferguson, J. H.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **46**, 80 (1941). — [82] Ware, A. G.,

M. M. GUEST and W. H. SEEGERS: Amer. J. Physiol. **150**, 58 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 721 (1948). — [83] ARNETH, I.: Qualitative Blutlehre und Blutkrankheiten, 2. Aufl. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1945. — [84] NOLF, P.: Schweiz. med. Wschr. **1945**, 78. — [85] BRINKHOUS, K. M.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.). **66**, 117 (1947). — [86] GRADDOCK, CH. G., and J. S. LAWRENCE: Blood **2**, 505 (1947). Schweiz. med. Wschr. **1948**, 391. — [87] VINCKE, E.: Z. exper. Med. **113**, 536 (1944). [88] VINCKE, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 497 (1947). — [89] VINCKE, E.: Pharmakol. **204**, 497 (1947). — [90] REINIS, Z., u. M. KUBIK: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 785. — [91] KAULLA, K. N. v., u. R. PULVER: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 806. — [92] PULVER, R., u. K. N. v. KAULLA: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 956. — [93] FLEMING, A.: Brit. med. J. **1947 II**, 242. — Chem. Zbl. **118**, 240 (1947). — [94] GRÖNWALL, A. I., B. G. A. INGELMANN u. H. F. MOSIMAN: Franz. Pat. 914844 (1945). — Chem. Zbl. **119**, 491, 518 (1948). — Schwed. Pat. 118014 (1945). — [95] HUSEMANN, E., K. N. v. KAULLA u. R. KAPPESSER: Z. Naturforsch. **1**, 584 (1948). [96] TANNER, E., u. F. SUTER: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 552. — [97] KOLLER, F., u. W. FRITSCHY: Helvet. med. Acta **14**, 263 (1947). — [98] GAEHTGENS, G.: Das Vitamin K in der Physiologie und Pathologie der Frau und des Neugeborenen. Leipzig: Georg Thieme 1946. — [99] QUICK, A. I., u. M. STEFANI: J. biol. Chem. (Am.) **175**, 945 (1948). — [100] SCHÜLER, K.: Ärztl. Wschr. **1948**, 55. — [101] VINCKE, E.: Z. Naturforsch. **1**, 458 (1946). — [102] REICHEL, CH.: Z. Kinderhk. **64**, 449 (1944). — [103] QUICK, A. I.: Lancet **1947**, 379. — [104] HONORATO, R. and A. I. QUICK: Amer. J. Physiol. **150**, 405 (1947). — [105] HONORATO, R.: Amer. J. Physiol. **150**, 381 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 748 (1948). — [106] CHARGAFF, E., D. H. MOORE and A. BENDICH: J. biol. Chem. (Am.) **145**, 593 (1942). — [107] CHARGAFF, E., A. BENDICH and S. S. COHEN: J. biol. Chem. (Am.) **156**, 161 (1944). — [108] CHARGAFF, E.: In F. F. NORD u. O. H. WERKMAN, Advances in enzymology. — [109] CHARGAFF, E.: J. biol. Chem. (Am.) **160**, 350 (1945). — [110] CHARGAFF, E.: J. biol. Chem. (Am.) **161**, 389 (1945). — [111] CHARGAFF, E., u. R. WEST: J. biol. Chem. **166**, 189 (1946). — [112] CHARGAFF, E.: J. biol. Chem. (Am.) **173**, 253 (1948). — [113] SMITH, H. P.: A. P. 2408535 u. A. P. 2408536 — Chem. Zbl. **118**, 751 (1947). — [114] CHARGAFF, E.: J. biol. Chem. (Am.) **155**, 387 (1944). — Chem. Zbl. **118**, 606 (1947). — [115] KALNET, E.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 614. — [116] MILSTONE, I. H.: Science (N. Y.) **106**, 546 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 1332 (1948). — [117] CHARGAFF, E., and CH. GREEN J. biol. Chem. (Am.) **173**, 263 (1948). — [118] OVERMAN, K. S., and I. S. WRIGHT: J. biol. Chem. (Am.) **174**, 760 (1948). — [119] THOMAS, L.: Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **81**, 26 (1947). — Kongr.zbl. inn. Med. **118**, 470 (1948). — [120] QUICK, A. I.: Science (N. Y.) **106**, 591 (1947). — [121] MARX, R., u. H. BAYERLE: Ärztl. Forsch. **2**, 249 (1948). — [122] HALSE, TH.: Pharmazie **2**, 253 (1947). — [123] KAULLA, K. N. v.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 313. — [124] LOOMIS, E. C., C. GEORGE and A. RYDER: Arch. Biochem. (Am.) **12**, 1 (1947). — [125] ROCHA e SILVA, M., and S. O. ANDRADE: Science (N. Y.) **92**, 670 (1945). — [126] MILSTONE, H.: J. Immunol. (Am.) **42**, 109 (1941). — [127] CHRISTENSEN, L. R.: J. gen. Physiol. (Am.) **28**, 363 (1945). — [128] CHRISTENSEN, L. R., u. C. M. MCLEAN: J. gen. Physiol. (Am.) **28**, 559 (1945). — [129] FERGUSON, J. H.: Nature (Brit.) **149**, 439 (1942). — [130] KÜHNAU, J., u. V. MORGENSTERN: Naturw. **22**, 509 (1934). — [131] EAGLE, H.: J. exper. Med. (Am.) **65**, 613 (1937). — [132] EAGLE, H., and T. N. HARRIS: J. gen. Physiol. (Am.) **20**, 543 (1937). — [133] LOMINSKI, L.: J. Path. a. Bacter. **58**, 187 (1946). — [134] TAGNON, H. I.: Science (N. Y.) **95**, 334 (1942). — [135] TAGNON, H. I., C. S. DAVIDSON and F. H. L. TAYLOR: J. clin. Invest. (Am.) **21**, 525 (1942). — [136] KAPLAN, M. H., H. I. TAGNON, C. S. DAVIDSON and F. H. L. TAYLOR: J. clin. Invest. (Am.) **21**, 533 (1942). — [137] COHN, E. I.: Proc. amer. Phil. Soc. **88**, 3 (1944). — [138] TAYLOR, F. H. L., C. S. DAVIDSON, H. J. TAGNON, M. A. ADAMS, A. H. MACDONALD and G. R. MINOT: J. clin. Invest. (Am.) **24**, 698 (1945). — [139] COHN, E. I., L. E. STRONG,

W. L. Hughes, Jr. D. I. Mulford, I. N. Ashworth, M. Melin and H. L. Taylor: J. amer. chem. Soc. **68**, 459 (1946). — [140] Cohn, E. I., I. L. Oncley, C. E. Strong, W. L. Hughes and S. H. Armstrong: J. clin. Invest. (Am.) **23**, 417 (1947). — [141] Glazko, A. I.: J. clin. Invest. (Am.) **26**, 344 (1947). — [142] Shinowara, G. Y.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **66**, 456 (1948). — [143] Astrup, T. and S. Barling: J. Biol. Chem. (Am.) **133**, 761 (1940 . — [144] Astrup, T., and S. Barling: Acta physiol. Scand. **2**, 22 (1941). — [145] Astrup, T.iand S. Barling: Acta physiol. Scand. **4**, 45 (1943). — [146] Astrup, T., and M. Permin: Nature (Brit.) **159**, 681 (1947). — Chem. Zbl. **118**, 342 (1947). — [147] Permin, M.: Nature (Brit.) **160**, 571 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 500 (1948). — [148] Edsall, I. T.: Advances Protein Chem. **3**, 383 (1947). — [149] Richert, D., S. G. Miller and I. T. Edsall: Unveröffentl. (Vgl. 181). — [150] Utkin-Ljubowzow, L.: Biochem. Z. **188**, 134 (1927). — [151] Schmitz, A.: Z. physiol. Chem. **244**, 89 (1936); **250**, 37 (1937); **255**, 234 (1938). - [152] MacFarlane, R. G., and I. Pilling: Lancet **1946 I**, 888. — [153] MacFarlane, R. G.: J. Physiol. (Brit.) **106**, 104 (1947). — [154] Ferguson, H. I.: Science (N. Y.) **97**, 319 (1943). — [155] Tagnon, H. I., and I. P. Soulier: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **61**, 440 (1946). — [156] Delezenne, C., et E. Pogerski: C. r. Soc. biol. **55**, 690 (1903). — [157] Christensen, L. R.: J. Bacter. (Am.) **47**, 471 (1944). — [158] Croxatto, H., and R. Croxatto: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **66**, 191 (1948). — [159] Tillet, W. S., and R. L. Garner: J. exper. Med. (Am.) **58**, 485 (1933). — [160] Graffon, M.: Acta Biol. Bctę **2**, 66 (1942). — [161] Kaplan, M. H.: J. clin. Invest. (Am.) **25**, 331 (1946). — [162] Ferguson, I. H., B. L. Travis and E. B. Gertheim: Proc. Soc. exper. Med. a. Biol. (Am.) **64**, 285 (1947). — [163] Halse, Th.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 728. — [164] Halse, Th.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 121, 221. — [165] Noif, P.: Medicine (Am.) **17**, 381. (1938). — [166] Jackes, L. B., and E. T. Waters: J. Physiol. (Brit.) **99**, 454 (1941). [167] Scroggie, A. E., L. B. Jackes and M. Rocha e Silva: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **66**, 326 (1948). — [168] Halse, Th.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 411. — [169] Halse, Th.: Z. inn. Med. **2**, 613 (1948). — [170] Briggs, R., R. G. MacFarlane and I. Pilling: Lancet **1947**, 402. — [171] Burdon, K. L.: J. Bacter. (Am.) **41**, 62 (1941). — [172] Rocha e Silva, M., and R. M. Teixeira: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **61**, 376 (1946). — [173] Ungar, G.: Lancet **1947**, 708. — Chem. Zbl. **118**, 996 (1947). — [174] MacFarlane, R. G.: Lancet **1937 I**,10. — [175] Schmidt, A.: Zur Blutlehre. Leipzig: 1893. Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden: Bergmann 1895. — [176] Waldschmidt-Leitz, E.: Z. physiol. Chem. **183**, 39 (1929). — [177] Presnell, A. K.: Amer. J. Physiol. **122**, 596 (1938). — [178] Hougardy, A.: Ann. Physiol.(Fr.) **10**, 65 (1934). — [179] Jaques, L. B.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1181 (1938). — [180] Mommarts, W. F. M.: J. gen. Physiol. (Am.) **29**, 103, 113 (1945). — [181] Hudemann, S.: Kolloid.Z. **92** 189 (1940). — [182] Ferry, I. O., and P. R. Morrison: J. amer. chem. Soc. **69**, 388 (1947). — [183] Morrison, P. R.: J. amer. chem. Soc. **69**, 2732 (1947). — [184] Wöhlisch, E.: Kolloid.Z. **85**, 179 (1938). — [185] Bailey, K., W. T. Astberry u. K. M. Rudall: Nature (Brit.) **151**, 716 (1943). [186] Ruska, H., u. C. H. Wolpers: Klin. Wschr. **1939**, 1037; **1940**, 695. — [187] Wolpers, C. H.: Klin. Wschr. **1941**, 424. — [188] van Zandt Hawn, Cl., and K. R. Porter: J. exper. Med. (Am.) **86**, 285 (1947). — [189] Seegers, W. H., M. Nieft and I. M. Vandenbelt: Arch. Biochem. (Am.) **7**, 15 (1945). — [190] Oncley, I. L., G. Scatchard and A. Brown: J. Physiol. colloid. Chem. **51**, 184 (1947). — [191] Ferry, I. D., and P. R. Morrison: J. amer. chem. Soc. **69**, 400 (1947). — [192] Ferry, I. D., M. Singer, and P. R. Morrison: J. Amer. chem. Soc. **69**, 408 (1947). — [193] Armstrong, S. H. jr., M. I. E. Budka and K. C. Morrison: J. Amer. chem. Soc. **69**, 416 (1947). — [194] Edsall, I. T., I. F. Foster and H. Scheinberg: J. amer. chem. Soc. **69**, 2731 (1947). — [195] Glazko, A. I., and I. H. Ferguson: Proc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45**, 436 (1940). — [196] Glazko, A. I., and

I. H. Ferguson: J. gen. Physiol. (Am.) **24**, 169 (1940). — [197] Glazko, A. J., and Greenberg: Amer. J. Physiol. **128**, 399 (1940). — [198] Lenggenhager, K.: A. Schweiz. med. Wschr. **1946**, 410. — [199] Seegers, W. H.: J. physic. colloid. Chem. **51**, 198 (1947). — Chem. Zbl. **119**, 1588 (1948). — [200] Kohl, H.: Klin. Wschr. **1946**, 157. — [201] Kohl, H.: Med. Klin. **42**, 535 (1947). — [202] Halse, Th.: Klin. Wschr. **1948**, 425. — [203] Wilander, O.: Skand. Arch. Physiol. (D.) **1942**. — [204] Jorpes, J. E., Geoffry Cumberledge: Oxford: Univ. Press 1947. — [205] Wolfram, M. L., and W. H. McNeeley: J. amer. chem. Soc. **67**, 748 (1945). — Chem. Zbl. **118**, 607 (1947). — [206] Risser, W. C.: J. Amer. Soc. **68**, 341 (1946). — Chem. Zbl. **118**, 1377 (1947). — [207] Oliver, I., F. Bloom and C. Mangieri: J. exper. Med. (Am.) **86**, 107 (1948). — [208] Wunderly, Ch.: Nature (Brit.) **160**, 228 (1947). — Chem. Zbl. **118**, 1590 (1947). — [209] Jorpes, I. E., and S. Gardell: J. biol. Chem. (Am.) **176**, 267 (1948). — [210] Brinkhous, K. M., H. P. Smith, E. D. Warner and W. H. Seegers: Amer. J. Physiol. **125**, 683 (1939). — [211] Quick, A. I.: Amer. J. Physiol. **115**, 317 (1936); **123**, 712 (1938). — [212] Knüchel, F.: Biochem. Z. **318**, 227, 237 (1948). — [213] Grüning, W.: Klin. Wschr. **1941**, 921. — [214] Jackes, L. B., and E. T. Waters: J. Physiol. (Brit.) **99**, 454 (1941). — [215] Quick, A. I.: Amer. J. clin. Path. **15**, 564 (1945). — [216] McClean, I.: Bull. Hopkins Hosp., **31**, 453 (1920). (Vgl. 181.) — [217] Michaelis, L.: Biochem. Z. **234**, 139 (1931). — [218] Wöhlisch, E., W. Diebold u. O. Kiderlen: Pflügers Arch. **237**, 599 (1936). —. [219] Horn, Z., u. L. Borsodi: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 1068. — [220] Ströder, I., u. G. Karp: Arch. Kinderhk. **134**, 6 (1947). — Chem. Zbl. **118**, 353 (1947). — [221] Rehn, E.: Dtsch. med. Wschr. **1948**, 435. — [222] Zosgriff, St. W., R. I. Cross and D. V. Habif: J. amer. med. Assoc. **138**, 405 (1948).

Dr. Herm. E. Schultze, Marburg a. d. Lahn,
Behringwerke, Chem. Abteilung.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 203—212 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Über die Ausscheidung des Pyramidons im Harn.

Von

Konrad Pohle und Hubert Went.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Dezember 1948.)

Als Jaffé[1, 2] um die Jahrhundertwende erkannte, daß Pyramidon im Harn nicht unverändert zur Ausscheidung gelangt, begann er als einer der ersten, nach den im Körper sich bildenden Umwandlungsprodukten zu forschen, wobei er sein Interesse zunächst dem im Pyramidonharn auftretenden roten Farbstoff zuwandte, und tatsächlich glückte es ihm sehr bald, diesen Farbstoff rein darzustellen, ihn seiner Konstitution nach als *Rubazonsäure* aufzuklären und ihn auf diese Weise als Ausscheidungsprodukt des Pyramidons zu erweisen, und wenig später vermochte er in Gestalt des *Antipyrylharnstoffs* auch noch ein zweites Abbauprodukt zu fassen.

Schon bei diesen ersten Arbeiten fiel Jaffé nun aber weiter auf, daß anscheinend nach Pyramidongebrauch auch noch ein dritter, und zwar stark reduzierender Stoff im Harn erscheint, doch führten seine auf Reindarstellung gerichteten Bemühungen hier zunächst leider nicht zum Ziele, und erst Enklewitz[3] hat neuerdings berichtet, daß ihm zwar nicht die Isolierung gelang, aber die Herstellung weitgehend gereinigter Fraktionen, und bei der Untersuchung derartiger angereicherter Lösungen konnte er dann feststellen, daß die fragliche Substanz alle Eigenschaften einer *Glukuronidverbindung* zeigte: sie gab negative Gärprobe, aber positive Orcin- und positive Naphthoresorcinreaktion; sie zeigte bei Prüfung im polarisierten Licht ungespalten Linksdrehung, nach Säurespaltung Rechtsdrehung, sie lieferte bei Behandlung mit p-Bromphenylhydrazin das von Neuberg[4] beschriebene, gut kristallisierende und leicht durch den Schmelzpunkt bestimmbare Hydrazinderivat, kurz Enklewitz fand alle Reaktionen einer gepaarten Glukuronsäure, und wenn die Reindarstellung vorläufig auch noch aussteht, so wird man angesichts aller dieser Beobachtungen doch nunmehr wohl von der Annahme ausgehen dürfen, daß zu den Endprodukten des Pyramidonstoffwechsels tatsächlich auch eine Glukuronidverbindung gehört.

Um weiter nun auch einen gewissen Einblick in die *quantitativen* Verhältnisse zu gewinnen, hat Enklewitz im Anschluß an seine qualitativen

Analysen sich bemüht, die Ausscheidung des von ihm entdeckten Stoffes auch mengenmäßig klarzustellen.

Dabei hat er sich der BENEDICTschen Zuckerbestimmung[5] bedient und gestützt einerseits auf eigene Beobachtungen, bei denen die pyramidongekoppelte Glukuronsäure etwa gleiches Reduktionsvermögen zeigte wie freie Glukuronsäure und gestützt andererseits auf ältere Beobachtungen von THIERFELDER[6], bei denen die freie Glukuronsäure ihrerseits etwa gleiche Reduktionskraft zeigte wie Glukose, hat er eine Reihe von Bilanzversuchen einfach in der Weise durchgeführt, daß er gesunden Personen Dosen von 2 g Pyramidon verabreichte, den Harn sammelte und analysierte, und indem er die gefundenen Reduktionswerte jeweils als Glukose berechnete, hat er dann aus den Zuckerwerten das Maß der Glukuronidausscheidung zu erschließen versucht.

Bei der Aufstellung seiner Bilanzen wählte ENKLEWITZ nun aber die im 24-Stunden-Harn enthaltene Gesamtreduktion als Grundlage und betrachtete diese Gesamtreduktion als Maßstab der Glukuronidausscheidung, ein Verfahren, welches angesichts der Tatsache, daß der Harn ja auch noch andere reduzierende Substanzen enthält, wohl kaum als ganz zuverlässig gelten kann und wenn ENKLEWITZ bei dieser Berechnungsweise eine gesetzmäßige Beziehung zwischen Aufnahme und Ausscheidung findet, nämlich auf je 1 g verabreichtes Pyramidon etwa 1 g Glukose ermittelt und als Gesamtergebnis seiner Bilanzversuche darauf hin feststellt, daß Pyramidonaufnahme stets zu einer etwa gleich großen Zuckerausscheidung führt, so wird man daraus nicht ohne weiteres schließen dürfen, daß diese Zuckerausscheidung nun wirklich ihrem vollen Betrag nach Glukuronsäure darstellt.

Bedenkt man, daß beim Zustandekommen der normalen Harnreduktion zwar Glukose [7,8,9] selbst wohl kaum eine Rolle spielt, daß dafür aber zahlreiche andere teils von Darmbakterien gebildete Kohlenhydrate, teils aus der Nahrung stammende und für den Körper nicht weiter verwertbare Mono- und Polysaccharide [10,11] sich wirksam zeigen, die zusammen einen recht beachtlichen Betrag ausmachen, und einer täglichen Ausscheidung von mindestens 1,0—1,5 g Glukose entsprechen [10,12,13] und vergegenwärtigt man sich andererseits, daß die nach 2,0 g Pyramidon im Harn zu erwartende Glukuronidmenge auch nicht viel größer, sondern ihrem Reduktionswert nach höchstens auf 1,5 g Glukose zu veranschlagen ist, dann wird klar, daß ein die vorgenannten Kohlenhydrate miterfassendes und obendrein auch noch durch andere Substanzen wie Kreatinin beeinflußtes Verfahren wie die BENEDICTsche Zuckertitration leicht Fehler bedingt, die die Glukuronidausscheidung um 50 bis 100% zu hoch erscheinen lassen. Daß die Fehlerquote sich tatsächlich in dieser Größenordnung hält, ist im übrigen aus ENKLEWITZ' eigenen Versuchen zu erschließen. Wenn er in erstaunlich guter Übereinstimmung nämlich auf je 2,0 g Pyramidon jeweils 2,0 g Glukose errechnet, so ist dazu erstens zu sagen, daß dieser Betrag schon von vornherein um nahezu 30% den aus dem Äquivalentgewicht sich ergebenden theoretischen Maximalwert von 1,558 g Glukose übersteigt, zweitens ist zu berücksichtigen, daß nach JAFFÉ auch die Rubazonsäure mit durchschnittlich 3%[1] an der Pyramidonausscheidung beteiligt ist; und beim Antipyrylharnstoff schließlich, dem eingangs erwähnten dritten Endprodukt, erzielte JAFFÉ trotz aller mit der präparativen Reindarstellung aus Harn verknüpften unvermeidlichen Verluste sogar Ausbeuten von etwa 6%, ein Hinweis darauf, daß der Antipyrylharnstoffanteil in Wahrheit sicherlich mit 10—12%, wenn nicht vielleicht noch höher zu bewerten ist, d. h. aufs Ganze gesehen ergibt sich auch hier das gleiche Bild; auch bei ENKLEWITZ ist der Gesamtfehler mit 50% wohl kaum zu hoch gegriffen.

Aus den vorstehenden Überlegungen folgt somit, daß eine einigermaßen zuverlässige Bestimmung der pyramidongekoppelten Glukuronsäure nur mit Hilfe einer Methode möglich sein wird, die die übrigen reduzierenden Harnbestandteile auszuschalten gestattet, und da nun das Benedictsche Verfahren nur eine Bauschanalyse darstellt, welche jeweils nur einen gewissen der Empfindlichkeit des Verfahrens entsprechenden Gesamtbetrag an reduzierenden Substanzen anzeigt, dagegen nicht erlaubt, den Anteil der einzelnen Stoffe getrennt voneinander zu ermitteln, so haben wir den Versuch unternommen, den Anteil der übrigen reduzierenden Harnbestandteile — der „Restreduktion", wie sie im folgenden genannt werden soll — auf *indirektem* Wege vorauszubestimmen. Indem wir bei der Untersuchung von Pyramidonharnen diese Zahlen dann jeweils als Leerwert in Abzug brachten, haben wir uns bemüht, einen etwas klareren Einblick in die Ausscheidungsverhältnisse der pyramidongebundenen Glukuronsäure zu erlangen.

I. Bestimmung der Restreduktion.

Als ersten Schritt haben wir eine Reihe von Vorversuchen ausgeführt, die zunächst einmal nur dem Zwecke dienten, das Verhalten der normalen Harnreduktion klarzustellen, und das Ausmaß der kleinen tageszeitlichen Schwankungen unter möglichst *einheitlichen* und gleichförmigen Bedingungen kennenzulernen; so waren wir z. B. bestrebt, die zeitlichen Untersuchungsabstände möglichst gleichmäßig zu wählen, und den Harn in streng eingehaltenen 2stündigen Perioden zu sammeln. Ferner wurden nur männliche Versuchspersonen herangezogen, keine Frauen, da nach Lavesson [14] u. a. Frauenharn ein geringeres durchschnittliches Reduktionsvermögen aufweist; drittens wurde den Versuchspersonen im Hinblick auf den Kreatinstoffwechsel [15] nur leichte körperliche Arbeit erlaubt, keine ausgesprochene Schwerarbeit; viertens wurden Alkohol, Bohnenkaffee, Schwarzer Tee und andere stark diuretisch wirkende Drogen und Gewürze vermieden. Da wir weiterhin seit Folin und Berglund [10] wissen, daß verabreichte Glukose im Harn zwar kaum als solche wieder erscheint, daß sie aber den Abbau von anderen für den Körper sonst nicht oder nur schwer verwertbaren Kohlenhydraten wie z. B. Laktose und Galaktose erleichtert und daß sie unter Umständen auf diesem Umwege die Restreduktion beeinflußt, so schien es uns schließlich auch nicht ratsam, an den Versuchstagen Marmelade, Sirup, Honig und ähnliche den Zuckerstoffwechsel besonders akut belastende Speisen zu geben, vielmehr wurde die Nahrungsaufnahme vorsichtshalber auf eine im wesentlichen aus Nährmitteln, Kartoffeln und Gemüse bestehende und im übrigen den heutigen Verhältnissen entsprechend fleisch- und fettarme Kost abgestellt.

Trotz aller getroffenen Maßnahmen trat ein ausgleichender Einfluß aber nicht in Erscheinung, vielmehr zeigte die nach Benedict bestimmte und als Glukose berechnete Harnreduktion auch unter den standardisierten Bedingungen des Versuches noch ein recht unterschiedliches Verhalten. Sie lieferte vielfach Werte, die selbst bei aufeinanderfolgenden Proben bis zu 50% differierten, woraus wir zunächst einmal den Schluß zogen, daß es nicht angängig ist, im Hauptversuch mit

Pyramidon einfach einen beliebigen, kurz vor Beginn oder kurz nach Beendigung der Ausscheidungsperiode ermittelten Wert als „Restreduktion" in Abzug zu bringen. Ebenso konnten wir uns auch nicht zu dem Verfahren entschließen, einen für den ganzen Tag errechneten

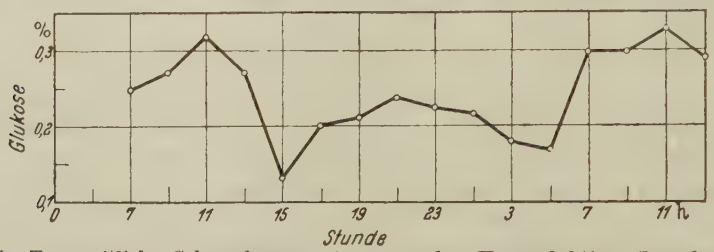


Abb. 1. Tageszeitliche Schwankungen der normalen Harnreduktion (berechnet in Prozent Glukose). Einzelversuch vom 6./7. 4. 48 (K. P.)

Durchschnitt als Leerwert einzusetzen, denn bei mehrere Tage hintereinander erfolgenden Prüfungen zeigten auch die als Durchschnitt errechneten täglichen Mittelwerte noch recht beachtliche Unterschiede.

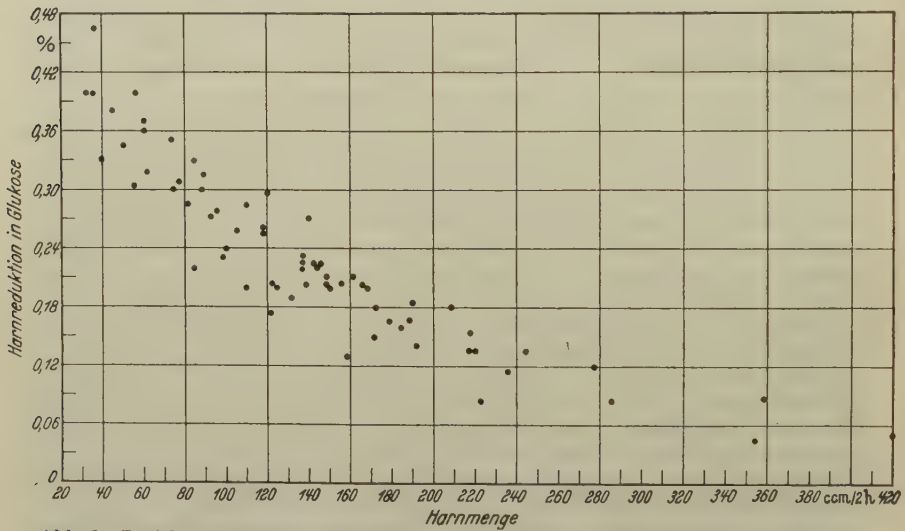


Abb. 2. Beziehungen zwischen Harnmenge und Harnreduktion bei Untersuchung in zweistündigen Tagesproben. (Übersicht über 70 von 3 Personen stammende Einzelversuche.)

Als wir versuchsweise darauf die Schwankungen unserer zweistündigen Reduktionswerte einmal mit den Schwankungen der jeweils zugehörigen Harnmengen verglichen, zeigte sich uns aber ein anderer Weg, und zwar stellte sich bei graphischer Gegeneinanderstellung heraus, daß unsere Reduktionswerte sich hier nun in ganz unverkennbarer Abhängigkeit ordneten, derart, daß im Rahmen einer gewissen Streuung

reichlichen Harnmengen jeweils niedrige, spärlichen Harnmengen hohe Konzentrationen entsprachen. Mit anderen Worten: Wir fanden eine ganz offensichtliche Beziehung im Sinne einer umgekehrten Proportion; da nun schon seit langem bekannt ist, daß in deutlichem Zweiphasenablauf nach Pyramidon anfänglich antidiuretische [16, 17, 18, 19, 20] und später diuretische [19] Wirkungen zu erwarten sind, und im Hauptversuch sonach von vornherein mit erheblichen Schwankungen der Harnmenge gerechnet werden mußte, so erschien uns dieser Gesichtspunkt vor allen anderen Erwägungen beachtenswert und wir entschlossen uns zu dem Versuch, die Restreduktion aus der Harnmenge abzuleiten.

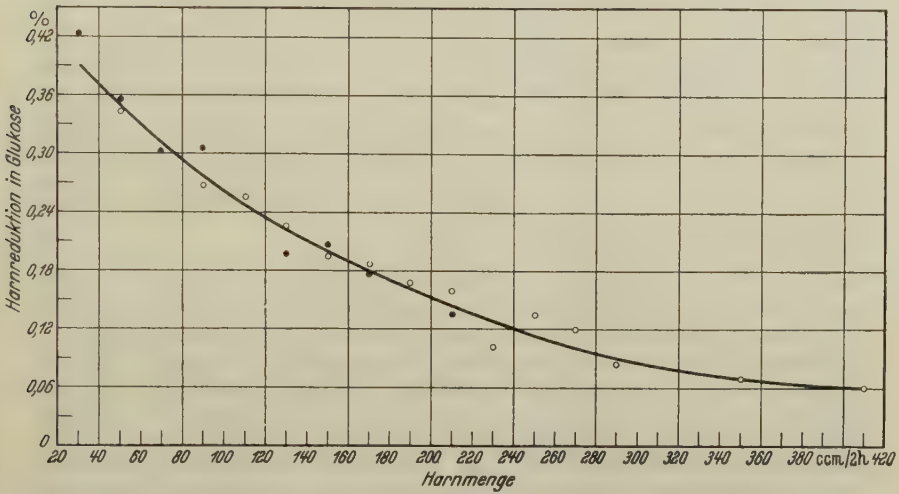


Abb. 3. Idealkurve der Beziehung Harnmenge-Harnreduktion konstruiert aus den Mittelwerten von 2 Versuchspersonen (K. P. = ●; H. W. = ○).

Um dies Vorhaben aber durchführen zu können, war es zuvor erforderlich, unser von Zufälligkeiten der Streuung allzusehr beherrschtes Diagramm etwas umzugestalten, und an Stelle der Punktdarstellung eine Kurvendarstellung zu zeichnen; hierbei gingen wir so vor, daß wir der jeweiligen Größe der zweistündigen Harnausscheidung entsprechend zunächst einmal Stufen bildeten, von 1—20, 21—40, 41—60 cm³ usw.; dann ordneten wir in jede Stufe die auf sie entfallenden Reduktionswerte ein, wobei wir aus Besorgnis vor individuellen Verschiedenheiten anfänglich für jede von uns herangezogene Versuchsperson Sondergruppen schufen und indem wir aus jeder der so gebildeten Untergruppen den Mittelwert zogen und zugeordnete Werte miteinander verbanden, gelangten wir schließlich zu 3 Kurven, die das gesuchte Abhängigkeitsverhältnis zunächst einmal individuell für jede Einzelperson zur Darstellung brachten.

Beim Ausziehen unserer Diagramme machten wir nun die Erfahrung, daß über unser Erwarten hinaus die 3 Kurven nicht nur einen annähernd analogen, parabelähnlichen Verlauf zeigten, sondern sie fielen praktisch gesehen überhaupt zusammen und wenn wir es angesichts von 3 Diagrammen auch noch nicht wagen, den Kurvenverlauf gleich bei

allen Menschen als identisch gleich anzunehmen, so schien es uns doch gerechtfertigt, wenigstens bei den beiden für den künftigen Hauptversuch in Aussicht genommenen Versuchspersonen uns mit einer gemeinsamen Kurve zu begnügen. In Abb. 3 ist diese Kurve zusammen mit den aus mehr als 60 Einzelversuchen errechneten individuellen Mittelwerten wiedergegeben. Wie leicht einzusehen, läßt ein solches Diagramm ohne weiteres für jede gegebene Harnmenge einen zugeordneten Reduktionswert ablesen. Über die Größe des dabei zu erwartenden Fehlers wird weiter unten noch zu sprechen sein.

2. Bestimmung der pyramidongebundenen Glukuronsäure.

In den Hauptversuchen erhielten die beiden vorerwähnten Versuchspersonen morgens nach Entleerung der Blase Gaben von jeweils 0,75 g Pyramidon, dann wurde der Harn wieder in zweistündigen Portionen gesammelt, die Harnmengen registriert, filtriert und nach Benedict titriert; die Reduktion wurde fortlaufend so lange bestimmt, bis die anfänglich unter Pyramidoneinwirkung steigenden Werte wieder fielen und endgültig die Norm erreichten.

Um bei diesen Bestimmungen störende Einflüsse des meist hochkonzentrierten und rubazonsäurehaltigen, gewöhnlich stark gefärbten Harnes tunlichst auszuschalten und den Titrationsumschlag möglichst deutlich zu gestalten, haben wir gewisse Vorsichtsmaßregeln, die wir schon bei den Voranalysen beobachteten, hier besonders gewissenhaft eingehalten: erstens waren wir bestrebt, die zur Titration benutzte Harnmenge einzuschränken und ließen nicht das ganze zum Umschlag benötigte Volumen in Form von Urin in die Vorlage eintropfen, sondern wir gaben jeweils nur genau 5 cm^3 Harn und führten die Analyse dann mit Hilfe einer 0,5%igen Glukoselösung zu Ende, d. h. wir ermittelten die Reduktion in Form einer Differenzbestimmung. Zweitens wurde zu jeder Bestimmung, um den Umschlag klar zu erkennen, eine frisch übertitrierte Vergleichsvorlage herangezogen; drittens wurde stets nur bei Tageslicht, oder unter der Tageslichtlampe, nicht bei gewöhnlichem Lampenlicht, titriert. Da wir die Erfahrung machten, daß oft von einem Tag zum anderen unsere Urin- und Glukoselösungen ihren Titer änderten, wurden stets frische Zuckerlösungen verwendet und die Harnproben innerhalb 2 Stunden aufgearbeitet.

Gestützt auf zahlreiche, nebenherlaufende Gärproben, die uns immer wieder zeigten, daß bei den kleinen von uns benutzten Pyramidonmengen noch keine störende Zuckerausschwemmung in den Harn erfolgt, wie das bei großen, subkutanen Gaben nach Chiari [21, 22, 23] u. a. zu befürchten steht, verfuhren wir bei der anschließenden Auswertung dann einfach in der Weise, daß wir von der Gesamtreduktion jeder Harnprobe zunächst einmal die oben erörterte „Restreduktion" in Abzug brachten, und der ganze danach verbleibende Betrag wurde dann als Glukuronsäure betrachtet und berechnet.

Insgesamt haben wir 6 derartige Versuche durchgeführt, bei jeder Versuchsperson 3, wobei wir, um Nachwirkungen mit Sicherheit auszuschließen, jedesmal einen Abstand von mindestens 10 Tagen einschalteten und wir kamen im ganzen dabei zu recht befriedigend übereinstimmenden Ergebnissen. Was zunächst die zeitlichen Verhältnisse,

Tabelle 1. *Glukuronidausscheidung nach Verabreichung von 0,75 g Pyramidon.* (Ausscheidungswert in Milligramm Glukuronsäure berechnet, Entgiftungsprozent auf Grund des Äquivalentgewichtes.)

Zeit nach Eingabe	Versuchsperson K. P.						Versuchsperson H. W.					
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
Stunden	Harn cm³	Glukuronsäure mg	Harn cm³	Glukuronsäure mg	Harn cm³	Glukuronsäure mg	Harn cm³	Glukuronsäure mg	Harn cm³	Glukuronsäure mg	Harn cm³	Glukuronsäure mg
0—2	42	4,5	35,5	3,8	38	4,2	60	29,1	78	29,4	66	27,3
2—4	32	51,7	29	51,6	31	55,4	90	43,7	240	90,6	84	50,2
4—6	48	62,1	52	47,6	50	65,3	76	47,1	272	73,3	91	86,4
6—8	100	48,5	124	20,1	112	51,9	100	80,8	133	28,7	126	49,8
8—10	87	28,1	126	44,1	129	29,5	165	44,5	196	42,3	145	43,3
10—12	108	23,3	110	29,6	107	26,3	203	49,2	247	20,0	210	22,0
12—14	140	0,0	115	0,0	133	0,0	134	0,0	225	0,0	198	0,0
Gesamtausscheidung . .		218,3		196,9		232,6		294,4		284,2		279,0
Pyramidonentgiftung (in Prozent der verabreichten Menge)		34,7%		31,2%		36,9%		46,7%		45,1%		44,3%

Anfang, Ende und Dauer der Ausscheidung anbetrifft, so lassen die vertikalen Spalten nebenstehender Tabelle deutlich erkennen, daß die Ausscheidung gewöhnlich etwa 1—2 Stunden nach der Einnahme einsetzte, nach 4—6 Stunden ihren Gipfel und mit 14 Stunden ihr Ende erreichte, und die beiden untersten, horizontalen Spalten zeigen weiter, daß sich auch mengenmäßig die Ausscheidung immer in etwa gleicher Größenordnung hielt. Mit einer zwischen 200—300 mg Glukuronsäure schwankenden Gesamtausscheidung fanden wir zwar Werte, die hinter dem molekularen Äquivalent 0,63 für 0,75 g Pyramidon und damit hinter der von Enklewitz gegebenen Schätzung ganz erheblich zurückbleiben, aber untereinander zeigen die Werte recht zufriedenstellende Übereinstimmung. Sie entsprechen etwa 30—45% der aufgenommenen Pyramidonmengen.

Ehe wir aus diesem Befund nun aber weitergehende Schlüsse ziehen, bedarf es zunächst noch einer Klärung der Frage, inwieweit die hier mitgeteilten Zahlen überhaupt Geltung beanspruchen, d. h. innerhalb welcher Fehlergrenzen sie als beweiskräftig angesehen werden können.

Um hierüber ein ungefähres Urteil zu gewinnen, haben wir bei jeder unserer beiden Versuchspersonen die normale Restreduktion mehrmals über den ganzen Tag hin fortlaufend bestimmt, dann zu der gefundenen Folge von 2-Stunden-Werten die der Tageszeit jeweils entsprechenden Glukuronsäurewerte eines beliebig herausgegriffenen Hauptversuches addiert und indem wir aus den so gewonnenen Summen rückwärts wieder die Gesamtausscheidung berechneten, und

zwar einmal unter Verwendung der Eichkurve, das andere Mal unter Verwendung der tatsächlich beobachteten Restreduktion, kamen wir bei jedem Einzelansatz zu 2 differierenden Werten, und bei wiederholten Parallelversuchen schließlich zu einer ganzen Schar teils positiver, teils negativer Abweichungen vom ursprünglich geltenden Wert des Hauptversuches; so gewannen wir ein Material, dessen Streuungsmittel wohl als annäherndes Maß der Fehlergröße angesehen werden darf.

Beziehen wir den Fehler auf die prozentualen Ausscheidungszahlen 31,2; 34,7 usw., so wie sie am Schluß obiger Tabelle angeführt sind, so ist er auf etwa 10% zu veranschlagen, d. h. bei jedem obiger Werte ist der Zusatz ± 10 zu denken und wir kommen somit zu dem Ergebnis, daß ungeachtet unserer Korrektur der Fehler tatsächlich noch recht beträchtlich bleibt und daß er unsere Befunde auf die Bedeutung von Annäherungswerten herabdrückt. Immerhin ist er aber doch keineswegs so groß, daß unsere Zahlen nicht wenigstens eine größenordnungsmäßig richtige Vorstellung der Ausscheidungsverhältnisse vermitteln könnten. Unter der wohl statthaften Voraussetzung, daß Pyramidon von sich aus die Restreduktion nicht allzusehr verändert, gewähren sie uns, wie wir glauben, im ganzen sicherlich ein etwas zuverlässigeres und der Wahrheit näherkommendes Bild als die Zahlen von Enklewitz.

Im übrigen sei anhangsweise erwähnt, daß die Restreduktion bei unseren Versuchen sich nicht nur von der Harnmenge — oder genauer gesagt, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit — als abhängig erwies, sondern anscheinend auch von der Tageszeit. Bei Klarstellung dieser Beziehungen besteht vermutlich die Möglichkeit, den Fehler noch weiter einzuschränken; aus Zeitgründen wurde darauf vorläufig verzichtet, doch sei betont, daß wir von Anfang an darauf Bedacht nahmen, unsere Versuche morgens zu stets gleicher Tagesstunde zu beginnen.

Wenn wir unsere Zahlen in dem vorstehend abgesteckten Rahmen als beweiskräftig ansehen, kommen wir zu dem Ergebnis, daß die Harnausscheidung des von Enklewitz entdeckten Glukuronids nicht mehr als etwa 25—50% der aufgenommenen Pyramidonmenge erreicht; da die Rubazonsäure nach Jaffé nur weitere 3% ausmacht, und auch Antipyrylharnstoff von ihm nur in Mengen von etwa 6% aus dem Harn gewonnen werden konnte, so zwingen unsere Befunde somit zu der Feststellung, daß die Frage der Pyramidonausscheidung vorläufig noch nicht abschließend beantwortet werden kann.

Wenn der Verbleib der restlichen 40—65% unserer Kenntnis sich vorläufig völlig entzieht, so ist damit aber noch nicht gesagt, daß dieser Fehlbetrag unbedingt die Annahme einer weiteren vierten, noch unbekannten Ausscheidungssubstanz erfordert, denn wenn man die Begleitumstände der bisherigen Versuche berücksichtigt, so ergeben sich genug Möglichkeiten, um das Defizit im Rahmen der 3 bereits bekannten Endprodukte zu erklären. So wurde eingangs ja schon betont, daß der mit 6% angesetzte Anteil des Antipyrylharnstoffes auf Grund eines präparativen, mit erheblichen Verlusten arbeitenden Verfahrens veranschlagt ist, und somit besteht durchaus die Möglichkeit, daß der wirkliche Anteil

das mehrfache beträgt. Zweitens weist das Vorkommen von Rubazonsäure darauf hin, daß beim Abbau des Pyramidons auch Kondensationsprodukte sich im Körper bilden, und solange die Konstitution des dritten als Glukuronid erkannten Endproduktes nicht eindeutig aufgeklärt ist, muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß in Wirklichkeit vielleicht auch die Anlagerung der Glukuronsäure an ein schon aus 2 Pyrazolonringen bestehendes Derivat erfolgt, und daß die von uns geübte Reduktionsbestimmung in Wahrheit auf die doppelte Pyramidonmenge hinweist. Zu erwägen ist drittens, daß sich der Körper bei der Ausscheidung von Arzneimitteln sehr häufig neben den Harnwegen auch der Gallenwege bedient und da nun bei den meisten bisher darauf geprüften Glukuroniden, wie Urochloralsäure [24], Menthol- [25, 26], Borneolglukuronsäure [27, 28] u. a. einerseits eine nur unvollständige Ausscheidung in den Harn festgestellt wurde, während andererseits Forscher wie Embden [29, 30], Whipple [31], Hemingway [32] und viele andere ihre Entstehung in der Leber wahrscheinlich machen, und Forscher wie Bial [33, 34] und Bonnani [35] den Übertritt reichlicher Mengen in die Galle direkt nachweisen konnten, so liegt es sicherlich nahe, auch beim Pyramidon-Glukuronid ähnliche Verhältnisse zu vermuten; wir neigen dazu, den festgestellten Fehlbetrag auf eine der hier angeführten Ursachen zurückzuführen*.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren beschrieben, welches gestattet, die nach Pyramidonbehandlung im Harn auftretende gepaarte Glukuronsäure annähernd quantitativ zu bestimmen. Benutzt wird die in zweistündigen Harnportionen nach Benedict ermittelte Gesamtreduktion abzüglich eines jeweils indirekt aus der Harnmenge errechneten Betrages zum Ausgleich für den durch anderweit reduzierende Substanzen bedingten Fehler.

Untersuchung der Ausscheidungsverhältnisse beim Menschen führt nach Eingabe von 0,75 g Pyramidon zu folgendem Ergebnis:

1. Die Ausscheidung beginnt etwa 1—2 Stunden und endigt etwa 12—14 Stunden nach der Einnahme. Maximum nach etwa 4—6 Stunden.

2. Die Ausscheidung entspricht insgesamt nur etwa 30—45% der aufgenommenen Pyramidonmenge. Von Enklewitz ermittelte höhere Werte werden kritisch besprochen.

3. Der Verbleib der restlichen dem Nachweis sich entziehenden Pyramidonmengen wird erörtert.

Literatur.

[1] Jaffé, M.: Ber. dtsch. chem. Ges. **34, II**, 2737 (1901). — [2] Jaffé, M.: Ber. dtsch. chem. Ges. **35, III**, 2891 (1902). — [3] Enklewitz, M.: J. Pharmacol. (Am.)

* Erst nach Abschluß der Arbeit erhielten wir Kenntnis von einem Vortragsreferat in der Pharmaz. Ztg **1948**, H. 17, 400, das über neue Versuche von Fretwurst u. Halberkann berichtet, nach denen beim Abbau des Pyramidons anscheinend doch noch weitere Endprodukte wie Amino- und Oxyantipyrin entstehen. Glukuronidbildner ist nach diesen Forschern das Oxyantipyrin. Soweit das kurze Referat ein Urteil gestattet, sind unsere beiderseitigen Befunde vielleicht nicht unvereinbar.

54, 100 (1935). — [4] Neuberg, C.: Ber. dtsch. chem. Ges. 32, II, 2395 (1899). — [5] Benedict, St.: J. biol. Chem. (Am.) 9, 57 (1910). — [6] Thierfelder, H.: Hoppe-Seylers Z. 11, 388 (1887). — [7] Eagle, H.: J. biol. Chem. (Am.) 71, 481 (1926). — [8] Hawkins, J., E. Mackay and D. van Slyke: J. biol. Chem. (Am.) 78, XXIII (1928). — [9] Laug, E., and Th. Nash: J. biol. Chem. (Am.) 108, 479 (1934). — [10] Folin, O., and H. Berglund: J. biol. Chem. (Am.) 51, 213 (1921). — [11] Greenwald, F., J. Gross u. G. McGuire: J. biol. Chem. (Am.) 75, 491 (1927). — [12] Benedict, St., E. Osterberg and I. Neuwirth: J. biol. Chem. (Am.) 34, 217 (1918). [13] Neuwirth, I.: J. biol. Chem. (Am.) 51, 11 (1921). — [14] Lavesson, H.: Biochem. Z. 4, 40 (1907). — [15] Eimer, K.: Z. exper. Med. 75, 428 (1931). — [16] Gessler, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 98, 257 (1923). — [17] Averbuck, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 157, 330 (1930). — [18] Brings, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 162, 515 (1931). — [19] Scherf, D.: Klin. Wschr. 1931, 1110. — [20] Franzolin, C.: Arch. Sci. med. 69, 511 (1940). Zit. nach Ber. Physiol. 122, 130 (1941). [21] Chiari, H., u. R. Rigler: Z. exper. Med. 46, 443 (1925). — [22] Högler, F.: Z. exper. Med. 84, 14; 84, 50 (1932). — [23] Högler, F., u. F. Zell: Z. exper. Med. 92, 222 (1934). — [24] Akamatsu, M., u. F. Wasmuth: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 99, 108 (1923). — [25] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) 61, 679 (1924). — [26] Nasarianz, B.: Schweiz. med. Wschr. 1934, II, 1090. Zit. nach Ber. Physiol. 85, 97 (1935). — [27] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) 80, 535 (1928). — [28] Pryde, J., and R. Williams: Biochem. J. (Brit.) 30, 799 (1936). — [29] Embden, G., u. K. Glässner: Hofmeisters Beitr. 1, 310 (1901). — [30] Embden, G.: Hofmeisters Beitr. 2, 591 (1902). — [31] Pelkan, K., and G. Whipple: J. biol. Chem. (Am.) 50, 513 (1922). — [32] Hemingway, A., J. Pryde and R. Williams: Biochem. J. (Brit.) 28, 136 (1934). — [33] Bial, M.: Z. klin. Med. 47, 489 (1902). — [34] Bial, M.: Hofmeisters Beitr. 2, 528, 532 (1902). — [35] Bonnani, A.: Arch. ital. Biol. 49, 127 (1908). Zit. nach Malys Jber. Tierchemie 38, 447 (1909).

Prof. Dr. K. Pohle, Halle, Leninstraße 22a,
Pharmakologisches Institut der Martin-Luther-Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 213—217 (1949).

Aus dem Physiologischen und allgemeinen Pathologischen Institut der Universität Debrecen (Direktoren: Prof. Dr. S. Went und Prof. Dr. L. Kesztyüs).

Die „cortinähnliche" Wirkung des g-Strophanthins.

II. Mitteilung.

Von

E. Varga, E. Füzes und L. Kesztyüs.

(Eingegangen am 27. November 1948.)

Unsere vorangehenden Untersuchungen bezüglich der Wirkungen des Strophanthins auf den Salzhaushalt des Organismus[1] bestätigen die Beobachtung von Zwemer[2] und Mitarbeitern laut der das Strophanthin die Lebensdauer der adrenalektomierten Tiere zu verlängern imstande ist. Nachdem aber die von Verzár ausgearbeitete Theorie[3] der Nebennierenrindenfunktion bzw. der Cortinwirkung das Cortin als einen Regulator der Phosphorylierungsprozesse darstellt, haben wir in unseren weiteren Untersuchungen die Wirkung des Strophanthins auf die Glykogenphosphorylierung geprüft. Nach unserer Meinung sind wir nämlich — so lange experimentelle Beobachtungen fehlen, wie weit die abgenommene Phosphorylierungsvermögen adrenalektomierter Tiere durch Strophanthin normalisiert werden kann — nicht berechtigt, über eine cortinähnliche Wirkung derselben zu sprechen.

Wir haben die ersten orientierenden Versuche an normalen Kaninchen nach der Methode von Lohmann[4], Schumann[5] und Verzár[3] durchgeführt. Die Tiere wurden verblutet, die möglichst schnell auspräparierten Oberschenkelstreckmuskeln mit einer Latapiemühle zermahlen und ein 20%iger Muskelbrei mit $^1/_4$% Glykogen enthaltender Natriumfluorid-Natriumbikarbonat-Pufferlösung hergestellt. Bestimmten Mengen des Breies wurde das Strophanthin in Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4}, in den Kontrollversuchen gleiche Mengen von physiologischer NaCl-Lösung zugesetzt. Gleich nach dem Zusatz des Strophanthins sowie nach 60 Min. lang dauerndem Stehenlassen auf Zimmertemperatur wurde der Gehalt der Breie an freiem, anorganischem Phosphat mit dem Havemannschen Photometer[6] bestimmt. Die prozentuale Abnahme des anorganischen Phosphats in 1 Stunde konnte als Indikator der Phosphorylierung des Glykogens betrachtet werden, weil durch das Natriumfluorid das Wiederfreiwerden des Phosphats aus organischer Bindung an der Triosephosphorsäurephase verhindert wird. In allen Versuchsreihen wurde einheitliches Muskelmaterial verarbeitet; die Phosphorylierungsprozesse verlaufen nämlich — nach unseren Erfahrungen — in verschiedenem Muskelgewebe mit verschiedener Intensität.

Tabelle 1 zeigt 5 Versuche an normalen Kaninchen.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ergeben diese 5 parallel durchgeführten Bestimmungen Werte von 62—84% Phosphatabnahme in 1 Stunde. Diese Ergebnisse sind nach Schumann, ferner nach Verzár und Montigel für die normale Glykogenphosphorylierung charakteristisch. In Gegenwart des Strophanthins in Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} blieb die prozentuale Phosphatabnahme, also die Glykogenphosphorylierung unbeeinflußt, indem die kleinen Abweichungen zwischen den Kontroll- und zwischen den Strophanthin enthaltenden Muskelbreien im Raum der methodischen Fehler liegen.

Tabelle 1. *Unbehandelte Kaninchen.*

Nr. der Tiere	Gesamt-anorganischer Phosphor mg-%	Phosphatabnahme 1 Stunde		
		ohne Zusatz %	g-Strophanthin-Konzentration 10^{-3} %	10^{-4} %
35	44,3	84	84,6	85,0
86	83,3	72,4	73,4	64,6
91	55,3	81,9	90,9	89,1
92	63,0	62,6	65,6	66,1
95	67,3	73,1	74,4	74,4

Ähnliche Versuche haben wir auch an normalen Katzen durchgeführt mit dem Unterschiede, daß bei diesen Tieren die linken Oberschenkelextensoren in Äthernarkose streng aseptisch exstirpiert waren. Die Operationswunden heilten binnen 8 Tage per primam. Die herausoperierten Muskeln wurden dann nach der oben beschriebenen Methode verarbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Unbehandelte Katzen.*

Nr. der Tiere	Gesamt-anorganischer Phosphor mg-%	Phosphatabnahme 1 Stunde		
		ohne Zusatz %	g-Strophanthin-Konzentration 10^{-3} %	10^{-4} %
22	57,8	62,5	64,9	55,7
404	55,0	72,7	63,4	67,4
123	63,0	76,2	71,4	76,2
14	62,3	74,6	72,5	73,3
501	65,0	65,4	72,3	75,3
327	71,6	68,8	50,0	52,7
7	76,0	56,6	59,2	58,6
77	46,5	64,5	70,9	70,9
13	66,0	65,2	66,6	67,4

Aus ihr geht hervor, daß die Phosphatabnahme in Breien normaler Katzenmuskeln mit der der Kaninchenmuskeln übereinstimmt (Mittelwert 56—76%). Auch in diesen Versuchen hatte das Strophanthin, in Konzentrationen von 10^{-3}—10^{-4}, keinen Einfluß auf die Phosphatabnahme, also die Glykogenphosphorylierung.

Es geht aber aus den Arbeiten von Verzár und Montigel hervor, daß weder bei normalen, noch bei adrenalektomierten, aber mit Percorten in kompensiertem Zustand erhaltenen Tieren die Phosphorylierung durch Nebennierenrindenhormon erhöht werden kann. Dies

bedeutet, daß wenn die Phosphorylierung des Glykogens optimal verläuft, weitere Hormonzusätze keine weitere Erhöhung derselben bewirken. Der Umstand also, daß das Strophanthin nicht imstande ist, in Gegenwart genügender Mengen von Nebennierenrindenhormon die Glykogenphosphorylierung zu beeinflussen, schließt die „cortinähnliche" Wirkung desselben noch immer nicht aus.

Als Fortsetzung unserer Untersuchungen haben wir bei den oben erwähnten steril operierten Katzen 2—3 Wochen später beide Nebennieren in Äthernarkose gleichzeitig exstirpiert; die Tiere erhielten 2 Tage vor und täglich nach der Operation 15 mg Percorten. Nach der Wundheilung (ungefähr 15—20 Tage nach der Adrenalektomie) wurden die Percorteninjektionen eingestellt. Am 4.—9. Tage nach Abbrechen der Percortenbehandlung entwickelte sich die Krise, deren Verlauf durch rektale Temperaturmessung verfolgt wurde. Bei Absinken der Körpertemperatur auf 32—34° C wurden die Tiere aus der Karotis verblutet und das Phosphorylierungsvermögen der rechten, unverletzten Oberschenkelextensoren in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen des Strophanthins und ohne Strophanthin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Adrenalektomierte Katzen.*

Nr. der Tiere	Gesamt-anorganischer Phosphor mg-%	Phosphatabnahme 1 Stunde								Bemerkung
		ohne Zusatz %	g-Strophanthin-Konzentration 10^{-4} %	10^{-5} %	10^{-6} %	10^{-7} %	10^{-8} %	10^{-9} %	10^{-10} %	10^{-11} %	
14	70,2	42,3	44,7	45,3	43,8	46,4	42,4	47,2	48,6	46,0	Krise Rektal-Temp. 34,0°
501	80,3	47,6	47,6	49,7	48,7	42,7	35,0	47,1	50,9	42,2	„ „ „ 34,0°
327	75,4	49,3	—	48,0	—	52,7	—	53,8	51,3	42,0	„ „ „ 33,8°
7	80,0	30,0	28,0	27,0	41,0	38,0	35,5	35,0	34,5	27,5	„ „ „ 33,4°
77	78,0	35,9	35,3	33,9	39,1	44,3	45,5	40,3	42,3	41,0	„ „ „ 34,6°
13	83,0	24,0	27,7	22,2	22,9	17,4	21,0	21,7	19,3	24,0	„ „ „ 33,8°

Die Zahlen in der Tabelle 3 zeigen eine wesentliche Abnahme der Glykogenphosphorylierung bei nebenniereninsuffizienten Katzen. Diese herabgesetzte Phosphorylierung konnte durch Strophanthin in Konzentrationen von 10^{-3}—10^{-12} in vitro nicht normalisiert werden. Die negativen und positiven Abweichungen gegenüber den Kontrollen liegen innerhalb der Fehlergrenzen. *Das Strophanthin besitzt also das wichtigste Merkmal der Cortinwirkung nicht*; die herabgesetzten Phosphorylierungsprozesse in den Muskeln nebennierenloser Tiere können durch Strophanthin nicht gesteigert werden.

Die Frage — ob das Strophanthin tatsächlich eine cortinähnliche Wirkung besitzt — muß also auf Grund der mitgeteilten Versuche verneint werden. Auf Grund der Lebensdauerbestimmung nebennierenloser

Tiere kann auf die cortinähnliche Wirkung des Strophanthins nicht gefolgert werden, denn durch Strophanthinbehandlung wird das Ionmilieu des Blutes beeinflußt; die Konzentrationssteigerung des Natriums und Senkung des Kaliums im Plasma verhindert die Eindickung des Blutes und beseitigt die dadurch hervorgerufenen Kreislaufstörungen; die durch Nebennierenrindeninsuffizienz bedingte Zellstoffwechselstörung — die Verhinderung der Phosphorylierungsprozesse — wird aber durch Strophanthinbehandlung nicht beeinflußt.

Als Nebenbefund möchten wir auf einige Versuche hinweisen, in denen das Phosphorylierungsvermögen des Herzmuskels normaler Hunde mit und ohne Strophanthin betimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. *Herzmuskel (unbehandelte Hunde).*

Nr. der Tiere	Gesamt-anorganischer Phosphor	Phosphatabnahme 1 Stunde								
		ohne Zusatz	g-Strophanthin-Konzentration							
	mg-%	%	10^{-4} %	10^{-5} %	10^{-6} %	10^{-7} %	10^{-8} %	10^{-9} %	10^{-10} %	10^{-11} %
15	52,4	28,4	30,3	29,3	29,3	28,4	28,4	30,3	28,4	25,5
17	49,5	20,2	19,1	16,1	—	—	17,1	15,1	15,1	16,1
18	46,0	22,8	—	—	23,9	18,3	—	23,9	19,5	23,9

Die Daten der letzten Tabelle zeigen, daß die Werte der Glykogenphosphorylierung des normalen Hundherzmuskels weit unter den normalen Phosphorylierungswerten der quergestreiften Skelettmuskeln liegen. Die prozentuale Abnahme des anorganischen Phosphats schwankt zwischen 20—30%. Strophanthin beeinflußt die Phosphorylierungsprozesse des Herzmuskels ebenfalls nicht.

Zusammenfassung.

Die Phosphatabnahme in Breien normaler Kaninchen- und Katzenmuskel blieb in Gegenwart des Strophanthins unverändert. Bei nebenniereninsuffizienten Katzen konnte die herabgesetzte Glykogenphosphorylierung durch Strophanthin nicht normalisiert werden. Das Strophanthin besitzt also das wichtigste Merkmal der Cortinwirkung nicht. Es ist also nicht berechtigt, über eine „cortinähnliche" Wirkung des Strophanthins zu sprechen.

Summary.

The glycogen phosphorylation by muscle pulps of rabbits and cats results in vitro a 55—80% decrease in the inorganic P within one hour. This process is not influenced by g-strophantin. In the muscles of adrenalectomized animals the phosphorylation drops to 20—40%

of the normal value and is not increased in vitro by g-strophantin. Neither can g-strophantin influence the phosphorylation of dog's cardiac muscle. According to the theory of VERZÁR the criterion of the cortin-action is a restitution of the intensity grade of the decreased phosphorylation. Since g-strophantin fails to exert such an action the assumption of its cortin like effect is not justified.

Literatur.

[1] VARGA, E., D. BAGDY u. L. KESZTYÜS: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **207**, 29 (1949). — [2] ZWEMER, R. L., B. E. LÖWENSTEIN and K. L. PINES: Endocrinology (Am.) **27**, 945 (1940). — ZWEMER, R. L., K. L. PINES and B. E. LÖWENSTEIN: Science (N. Y.) **1940 I**, 600. — ZWEMER, R. L., and B. E. LÖWENSTEIN: Science (N. Y.) **1940 I**, 75. — [3] VERZÁR, F., u. C. MONTIGEL: Helvet. chim. Acta **25**, 9, 22 (1942). — Helvet. physiol. Acta **1**, 115 (1943). — [4] LOHMANN, K., u. L. JENDRASSIK: Biochem. Z. **178**, 418 (1928). — [5] SCHUMANN, H.: Pflügers Arch. **243**, 686 (1940). — [6] HAVEMANN, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939); **306**, 224 (1940).

Dr. E. VARGA, Debrecen (Ungarn), Physiol. u. allgem. Pathol. Institut.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv. Bd. 207, S. 218—242 (1949).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. Bennhold).

Tierexperimentelle Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Colchicins in letalen und subletalen Dosen auf Blut und Knochenmark.

Von

Helmut Widmann.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Dezember 1948.)

Der belgische Pathologe A. P. Dustin fand 1935 mit seinem Schüler Lits im Colchicin, dem Alkaloid der Herbstzeitlose, ein karyoklastisches Gift von besonderer Aktivität.

Durch Dustin und seine Mitarbeiter haben das Colchicin und seine Derivate vorwiegend in vivo an der Maus, durch Ludford, Lettré, Bucher u. a. an der Gewebekultur von embryonalen Mäuselungen, Karzinomen und Kaninchenfibrozyten eine eingehende Bearbeitung erfahren. Als entscheidende Wirkung des Colchicins bezeichnet Dustin eine lebhafte Anregung der Teilungstätigkeit, der in der zweiten Phase eine Blockade der Mitosen in der Metaphase folgt. Während die Blockierung der Mitosen im ersten Stadium der Metaphase, Bucher bezeichnet sie als den typischen Colchicineffekt, von allen Untersuchern in vivo und vitro nachgewiesen wurde, konnte Brues an regenerierenden Rattenlebern und Bucher an der Gewebekultur von Kaninchenfibrozyten eine Anregung der Teilungstätigkeit, d. h. eine Zunahme des mitotischen Koeffizienten nicht nachweisen. Auch von Moellendorf, Baltzer, Tennant und Liebow finden keine Beweise für eine Zunahme der Teilungsbereitschaft durch Colchicin.

Die Anhäufung von Mitosen, die zweite Phase Dustins, nach Colchicin ist bereits 1906 Dixon im Knochenmark des Kaninchens aufgefallen. Er hat als erster, gemeinsam mit Malden, in experimentellen Colchicinvergiftungen am Kaninchen wesentliche Veränderungen des peripheren Blutbilds und des Knochenmarks unter der Einwirkung dieses Alkaloids nachgewiesen. Er fand nach Verabreichung von 5—6 mg/Kaninchen ein Absinken der Leukozyten, dem einige Stunden später eine erhebliche Leukozytose folgte. Die Vermehrung der Leukozyten betraf fast ausschließlich die polymorphzelligen Elemente, während ihm die Zahl der Lymphozyten im Verlauf der Vergiftung nicht verändert erschien. Dixon und Malden erklärten sich die rasch einsetzende Abnahme der Leukozyten durch eine Ansammlung der weißen Blutzellen in den Lungen- und Leberkapillaren. Sie nahmen ferner an, daß ein Teil der Leukozyten ins Knochenmark „zurückgetrieben" werde, das im Stadium der Leukozytose an Myelozyten abnehme. Sie führten die Leukozytose mit auf eine Kontraktion der Milz zurück. In großen Dosen sollte das Knochenmark durch Colchicin an Zellen verarmen, in kleinen Dosen wirke das Alkaloid dagegen als Reiz und begünstige die Entwicklung der Myelozyten.

Weitere tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Colchicins auf das Blutbild wurden 1932 von Beck bekanntgegeben. Nach einer Dosierung

von 0,1 mg/kg Kaninchen bestimmte Beck nach den wiedergegebenen Versuchsprotokollen in 2–4stündigen Zwischenräumen die Gesamtzahl der Leukozyten. Der Abfall der Leukozyten ist meist nicht als signifikant zu bezeichnen. Im Anstieg der Leukozyten wird aber die Colchicinwirkung deutlich, obwohl eine verwertbare Änderung im Differentialblutbild nicht beobachtet wurde. Die Wirkung dieser kleinen einmaligen Dosen konnte nach den Angaben Becks über einen Zeitraum bis zu 8 Tagen verfolgt werden.

1939 berichtete Borsetto über die Änderungen des Blutbilds bei Hunden nach Verabreichung von 3 mg/kg Colchicin, die nach 15—16 Stunden tödlich wirkten. Er entnahm in Abständen von 4 Stunden durch Punktion des Herzens Blut und fand nach einem anfänglichen Absinken der weißen Elemente eine Leukozytose, die durch die besondere Vermehrung der Polynukleären gekennzeichnet war. Er wies überdies eine Zunahme des Hämoglobins, der Erythrozyten und des Erythrozytenvolumens nach. Borsetto betont, daß seine Befunde nicht für einen Neubildungsreiz auf das Knochenmark sprechen, daß der Wirkungsmechanismus des Colchicins auf Blut und Knochenmark unklar sei.

Die Wirkung therapeutischer Dosen von Colchicin auf das Blutbild des Menschen wurde 1930 von Levison untersucht. Auch er konnte eine „wirksame Knochenmarksreizung" nicht nachweisen. Heilmeyer zitiert in seinem Handbuchband Das Gupta, der dem Colchicin eine echte, durch das Auftreten von Jugendformen gekennzeichnete leukopoetische Wirkung zuerkennt.

Landolt hat 1943 die Wirkung einmaliger und wiederholter Colchicingaben auf das normale Blutbild und Knochenmark des Menschen überprüft. Er fand bei seinen Untersuchungen nach 2, 5, 7 und mehr Stunden nur in einzelnen Fällen eine leichte Senkung, die von einem geringen, nur kurzdauernden Anstieg der Leukozyten gefolgt war. In allen Fällen konnte er eine erhebliche Vermehrung der Thrombozyten beobachten. Eine wesentliche Änderung der qualitativen Zellverhältnisse im Sternalmark fehlte. Auffallend war das Auftreten von Karyorhexis bei den Erythroblasten und Vakuolisierung der Zellkerne und des Protoplasmas bei den Zellen der Leukopoese.

Die Wirkung des Colchicins auf Blutbild und Knochenmark besitzt neben einem allgemeinen biologischen Interesse besondere Bedeutung für die Toxikologie, es sei auf die Arbeiten von Dustin jr. und Widmann verwiesen, und für die Frage der Behandlung der Leukämien (Paul und Mitarbeiter, Brodersen, Landolt, Kneedler, Heilmeyer, Merck und Pirwitz) mit dem Alkaloid der Herbstzeitlose. Unsere Arbeit sucht einen Beitrag zum Wirkungsmechanismus des Colchicins auf das weiße Blutbild und Knochenmark bei Verabreichung letaler und subletaler Giftmengen auf Maus und Meerschweinchen zu geben.

Methode.

Es wurden 22 weiße Mäuse von 16—17 g Gewicht in den Versuch genommen. 16 Tiere wurden mit je 100 γ Colchicin, also durchschnittlich mit 6,25 mg/kg subkutan vergiftet. In verschiedenen Zeitabständen wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen. Die Leukozytenzahl wird als Mittelwert aus 2 Kammerfüllungen angegeben. Die Differentialblutbilder wurden auf 200, zum Teil auch auf 400 Zellen ausgezählt. 10 Tiere wurden zwischen 1 und 18 Stunden nach der Colchicingabe durch Chloroform getötet, der Femur entnommen, gespalten und aus dem Oberschenkelmark Ausstriche angefertigt. Die Zeitspanne zwischen Tötung und Ausstreichen des Marks betrug nie mehr als 7 Min.

Der spontane Eintritt des Todes erfolgte bei der von uns gewählten Dosierung zwischen 18 und 30 Stunden.

Analog wurde mit 14 Meerschweinchen von 250—670 g Gewicht verfahren. Die Tiere erhielten 400—800 γ = 0,6—1,6 mg/kg subkutan injiziert. Das Blut wurde durch Einschnitte in die Venen der Dorsalseite des Ohres entnommen. Zwischen der Tötung der Tiere und der Fertigstellung der Knochenmarkspräparate vergingen auch hier nicht mehr als 7 Min.

Der Eintritt des Todes war abhängig von der Dosis und der Empfänglichkeit der Tiere. Meerschweinchen, die mit 1,4—1,6 mg/kg vergiftet wurden, starben 8—14 Stunden später. Ein Tier, das 0,6 mg/kg injiziert bekam, lebte noch nach 25 Stunden.

Das weiße Blutbild der Maus in Ruhe und nach Colchicin. In Übereinstimmung mit den Angaben KLIENEBERGERs finden auch wir eine außerordentliche Schwankungsbreite der Gesamtleukozytenzahl unsrer Versuchstiere. Unsre Werte lagen zwischen 6500 und 28000, der Durchschnittswert aller Tiere war 13900 Leukozyten. Auch das vorwiegend lymphozytäre Differentialblutbild zeigte von Tier zu Tier erhebliche Abweichungen. Unsre extremen Werte waren: 11,5% Segmentkernige, 86,5% Lymphozyten, 2% Schatten und 6% Stabkernige, 47% Segmentkernige, 43,5% Lymphozyten, 0,5% Monozyten und 3% Schatten. Diese Kernschatten entstehen durch das Ausstreichen der Schwanzvene bei der Gewinnung des Bluts; sie bestehen aus gequetschten Leukozyten- und Lymphozytenkernen. Je ergiebiger die Tiere bluteten, desto geringer war die Zahl der Kernschatten.

Nach orientierenden Versuchen fanden wir in kurzfristig durchgeführten Untersuchungen, daß bereits 20 Min. nach der subkutanen Verabreichung des Colchicins ein Abfall der Leukozyten nachweisbar wird. Alle Mäuse zeigen zwischen 40 Min. und 1 Stunde 25 Min. die tiefsten Leukozytenzahlen. Abb. 1 gibt bei 3 Tieren mit verschiedenen Ausgangswerten den Ablauf der Leukozytenbewegungen wieder. Besonders ausgeprägt erscheint der Abfall bei Maus IV: Nach 1 Stunde 5 Min. kommt es zu einem Rückgang von 27500 auf 10500 Leukozyten. Es folgt bei allen Tieren ein prinzipiell gleichverlaufender Anstieg, der in Beziehung zum zeitlichen Ablauf nur graduelle Unterschiede aufweist, die wir, nach dem Ergebnis der Knochenmarkuntersuchungen auf die „verschiedene Ansprechbarkeit" des Marks zurückführen möchten.

Die Gesamtleukozytenzahlen verdecken, genau wie die auf den Ausgangswert der Gesamtleukozyten bezogenen Prozentzahlen weitgehend die tatsächlichen Veränderungen des peripheren Blutbilds. Nach der Auswertung der Differentialblutbilder sehen wir in einem ausgeprägten Abfall der Granulozytenzahlen (s. Tabelle 1—3) in erster Linie das Wesen der leukopenischen Phase. Die absoluten Zahlen der als Granulozyten zusammengefaßten Zellen der myeloischen Reihe und die auf den Ausgangswert bezogenen Prozentangaben dieser

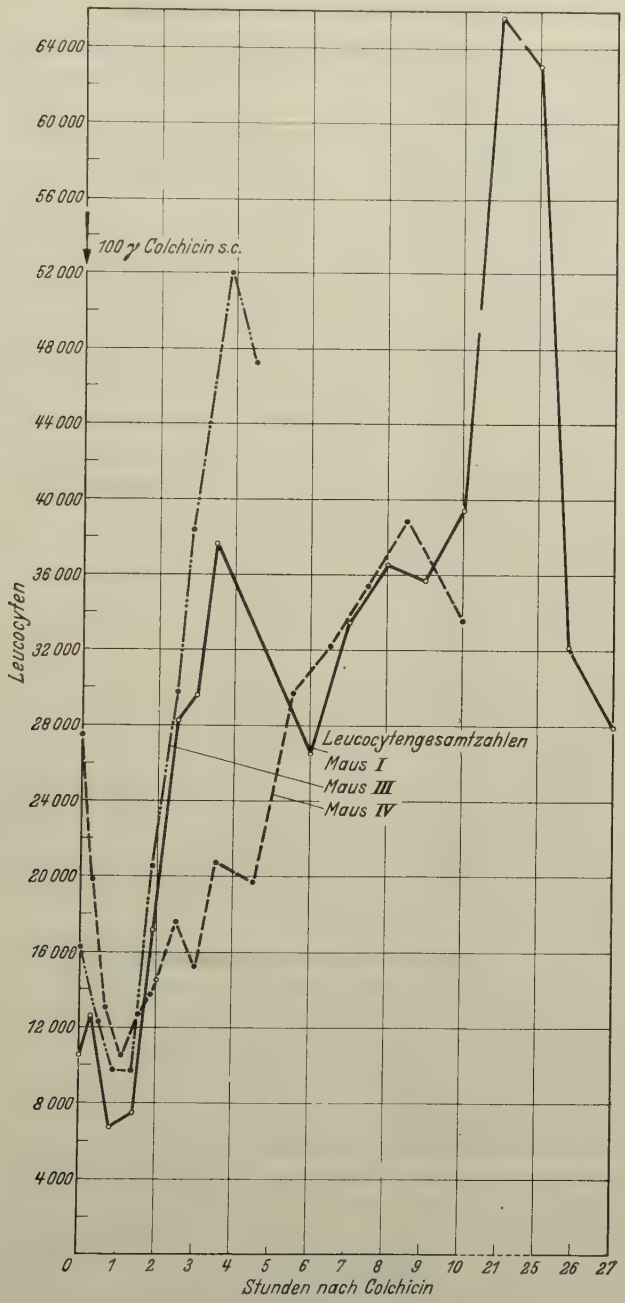


Abb. 1. Periphere Leukozytenbewegungen bei 3 Mäusen nach 100 γ Colchicin subkutan (6,25 mg/kg).

Zellen lassen die entscheidenden Blutbildbewegungen erkennen. So weist Maus K in Tabelle 2 nach 1 Stunde 15 Min. einen Abfall der Gesamtleukozyten auf, der noch innerhalb der doppelten Fehlerbreite liegt. Die Zahl der Granulozyten ist aber von 2072 auf 529, d. h. von 100% auf 25% zurückgegangen. Die Maus H, Tabelle 3, zeigt bei einem Rückgang der Gesamtzahl der Weißen auf 54% einen Abfall der Granulozyten auf 18%.

Auch der Anstieg der Leukozyten ist in erster Linie auf die Vermehrung der Zellen der myeloischen Reihe zu beziehen. Den beobachteten Höchstwerten der Gesamtleukozyten, die nach Tabelle 1 und 2 einer Zunahme auf 469 bzw. 620% des Ausgangswertes entsprechen, steht eine Zunahme der Granulozyten auf 535 bzw. 1182% gegenüber.

Der in Abb. 1 wiedergegebene Verlauf der Maus I zeigt nach 21 Stunden einen Höchstwert von 65600, in den letzten Stunden vor dem Spontantod kommt es zu einem raschen Absinken der Gesamtleukozyten auf 28000. Ein Verlauf, den wir wiederholt, auch beim Meerschweinchen, beobachten konnten.

Die Lymphozyten bleiben keineswegs von den durch Colchicin hervorgerufenen Veränderungen unberührt. Auch hier finden wir Abfall und Anstieg. Besonders deutlich ist bei mehreren Tieren die lymphatische Reaktion, die dem Anstieg der Granulozyten nahezu parallel geht. Es lassen sich hier Unterschiede im Verhalten der weißen Maus und des Meerschweinchens aufzeigen, die wohl auf die bei der Maus besonders ausgeprägte Bereitschaft lymphozytär zu reagieren, bezogen werden müssen.

Bei 5 Mäusen beobachteten wir, in Abhängigkeit von der Versuchsdauer, unreife Vorstufen der myeloischen Reihe im peripheren Blut, bei 2 Tieren Mitosen, die jugendlichen myeloischen Elementen entsprachen. Der Reifegrad der Kerne der segmentierten Granulozyten und der Lymphozyten war nach Colchicin oft in einem Gesichtsfeld sehr wechselnd. Neben normal strukturierten Zellen fanden sich solche mit pyknotischen Kernen. In allen Präparaten, die nach der 3.—4. Stunde nach Colchicin gewonnen wurden, konnten wir Normoblasten, vereinzelt auch Erythroblasten nachweisen.

Das weiße Blutbild des Meerschweinchens in Ruhe und nach Colchicin. Die Schwankungsbreite der Leukozyten bewegt sich in unsren Versuchen zwischen 4125 und 21450. Die entsprechenden Zahlen KLIENEBERGERs sind 5900 und 18825, die Zahlen SZÉKESSYs: 7000—26500. Unser Mittelwert aus der Gesamtleukozytenzahl aller Tiere beträgt 9640. Das Differentialblutbild, vorwiegend lymphozytär, zeigt von Tier zu Tier erhebliche Abweichungen. Unsre extremen Werte in Beziehung auf die Zahl der Granulozyten sind: 0,75% Stabkernige, 12% Segmentkernige, 7,25% Eosinophile, 79,75% Lymphozyten,

Tabelle 1. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten des Tieres J in absoluten Werten nach 100 γ Colchicin subkutan.*

Zeit	Ausgangswert	1 Stunde nach Colchicin	1 Stunde 20 Min. nach Colchicin	4 Stunden 10 Min. nach Colchicin	16 Stunden 25 Min. nach Colchicin	18 Stunden nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	10375	8900	7790	20125	48675	41750
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	85	**75**	192	**469**	424
Granulozyten	3502	1290	1530	5300	18750	17900
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**37**	44	151	**535**	494
Lymphozyten	7210	7610	6230	14371	29925	23850
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	106	**87**	199	**415**	331

Tabelle 2. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten des Tieres K in absoluten Werten nach 100 γ Colchicin subkutan.*

Zeit	Ausgangswert	1 Stunde 15 Min. nach Colchicin	3 Stunden 45 Min. nach Colchicin	15 Stunden 45 Min. nach Colchicin	16 Stunden 45 Min. nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	9750	7850	24315	60500	54400
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**80**	250	**620**	558
Granulozyten	2072	529	2188	24500	19580
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**25**	105	**1182**	945
Lymphozyten	7653	7321	22127	36000	34820
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**96**	289	**470**	455

Tabelle 3. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten des Tieres H in absoluten Werten nach 100 γ Colchicin subkutan.*

Zeit	Ausgangswert	1 Stunde nach Colchicin	1 Stunde 15 Min. nach Colchicin	4 Stunden 30 Min. nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	10000	5375	5075	13125
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	54	**51**	131
Granulozyten	2400	430	600	3478
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**18**	25	145
Lymphozyten	7600	4945	4475	9647
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	65	**59**	127

0,25% Monozyten und 2% Stabkernige, 61,5% Segmentkernige, 3,5% Eosinophile, 32,25% Lymphozyten und 0,75% Monozyten.

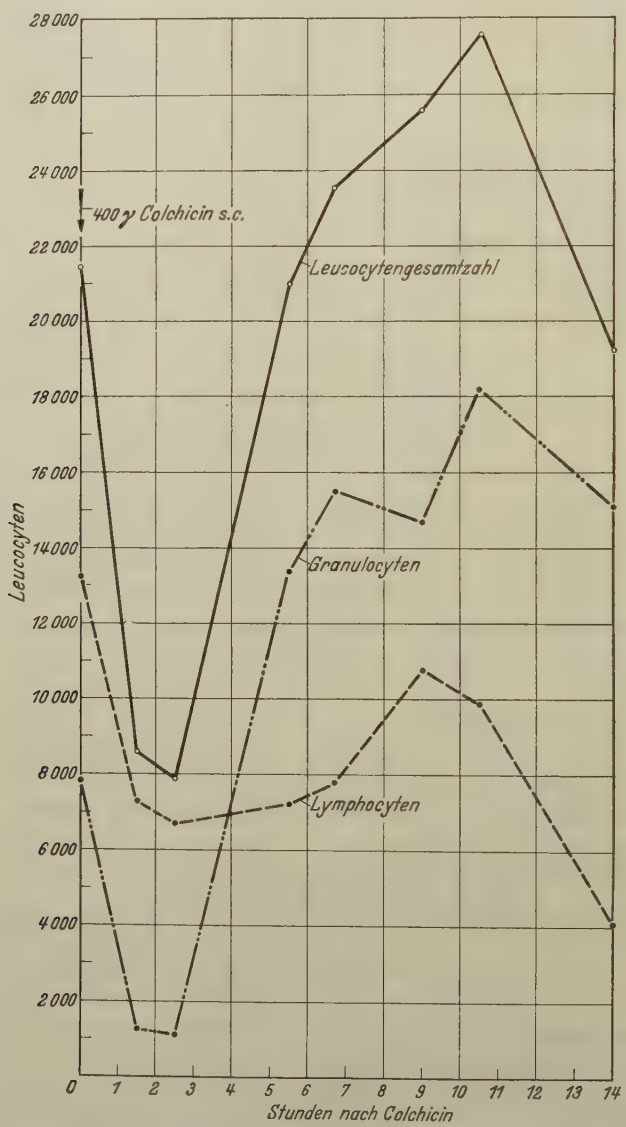


Abb. 2. Änderung des qualitativen Blutbildes des Meerschweinchens U nach 400 γ Colchicin subkutan (0,75 mg/kg).

Abb. 2 und 3 zeigen den Ablauf der Leukozyten- und Granulozytenbewegungen der Meerschweinchen U und W nach verschiedenen,

aber letalen Giftmengen. Eine sichere Abhängigkeit der Leukozytenbewegungen von der Höhe der von uns gewählten Colchicindosierung ist nicht nachzuweisen. Die tiefsten leukopenischen Werte finden wir zwischen 1 Stunde und 2 Stunden 30 Min., die Gesamtleukozyten sinken bis auf 27—50%, die Granulozyten bis auf 14—20% ab (Tabelle 4—6). Der Höchstwert, im Durchschnitt um die 10. bis 12. Stunde, ergibt eine Steigerung der Gesamtleukozyten bis auf 329%, der Granulozyten bis auf 387% des Ausgangswerts. Im Gegensatz zur weißen Maus erreicht die Leukozytose des Meerschweinchens in keinem Fall die hohen, bei mehreren Mäusen auch noch in den Stunden vor dem Spontantod nachgewiesenen Zahlen. Vielleicht ist die der Maus zugeschriebene, besondere metaplastische Fähigkeit in Milz und Leber die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens.

Zwei Tiere kehren nach 19 Stunden 25 Min. bzw. 23 Stunden 50 Min. mit ihren Leuko- und Granulozytenzahlen wieder zum Ausgangswert zurück oder sinken noch weiter ab. Da uns dieser Verlauf für das später zu besprechende Zusammenspiel: Knochenmark — peripheres

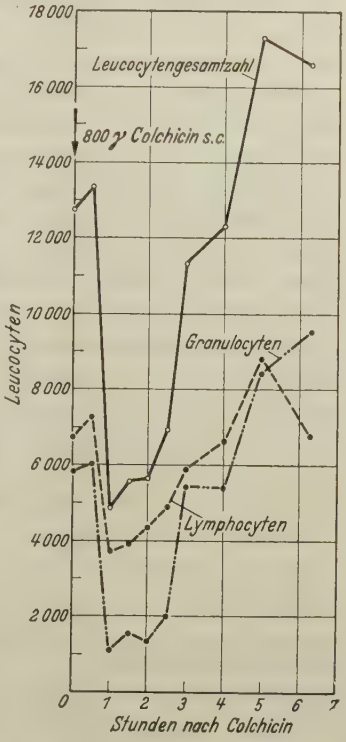


Abb. 3. Änderung des qualitativen Blutbildes des Meerschweinchens W nach 800 γ Colchicin subkutan (1,33 mg/gk).

Tabelle 4. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten des Tieres O, 260 g, 1,5 mg Colchicin/kg Meerschweinchen.*

Zeit	Ausgangswert	45 Min. nach Colchicin	1 Stunde 5 Min. nach Colchicin	1 Stunde 25 Min. nach Colchicin	1 Stunde 55 Min. nach Colchicin	2 Stunden 35 Min. nach Colchicin	3 Stunden 20 Min. nach Colchicin	7 Stunden 5 Min. nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	5225	3700	4250	2625	3425	4350	6350	11750
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	70	81	50	64	83	121	226
Granulozyten	758	259	361	236	514	625	1143	2937
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts . . .	100	34	47	31	67	82	150	387
Lymphozyten	4284	3441	3867	2389	2911	3654	5524	8812
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts . . .	100	80	90	56	68	85	129	206

Blutbild von besonderer Bedeutung erscheint, führen wir das Protokoll des Tieres R, Tabelle 5, mit an.

Das Verhalten der Lymphozyten des Meerschweinchens ist nicht so einheitlich wie das der Granulozyten. Wir haben den Eindruck, daß die Colchicinwirkung in einem beträchtlichen Ausmaß die Lymphozyten selbst schädigt. So zeigen 5 Versuchstiere (s. auch Tabelle 5 und 6) eine erhebliche Abnahme der absoluten Lymphozytenwerte. Es fehlt bei diesen Tieren der Anstieg der Lymphozyten während der ganzen Versuchsdauer. Im Gegensatz hierzu fehlt bei 1 Meerschweinchen der Abfall, es kommt zu einem eindeutigen Anstieg der Lymphozyten. Dieses Tier zeigte die niedrigsten Lymphozytenausgangswerte. Sein Blutbild ist nicht lymphozytär, wie wir dies sonst beim Meerschweinchen beobachten konnten. Wir vermuten, daß hierin mit ein Grund des abweichenden Verhaltens der Lymphozytenbewegungen dieses Tieres zu suchen ist.

Tabelle 5. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten des Tieres R, 670 g, 0,6 mg Colchicin/kg Meerschweinchen.*

Zeit	Ausgangswert	55 Min. nach Colchicin	1 Stunde 40 Min. nach Colchicin	2 Stunden 25 Min. nach Colchicin	3 Stunden nach Colchicin	6 Stunden 5 Min. nach Colchicin	7 Stunden 5 Min. nach Colchicin	23 Stunden 50 Min. nach Colchicin	24 Stunden 30 Min. nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	15250	8800	9375	12900	15375	15325	23475	6550	7850
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**57**	61	84	101	101	**154**	43	51
Granulozyten	7015	4620	3469	6192	8148	8429	14080	4421	5450
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	66	**49**	88	116	120	**207**	63	77
Lymphozyten	8235	4004	5675	6579	6304	6820	9020	2030	2170
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	**49**	70	78	76	83	**109**	25	26

Tabelle 6. *Verhalten der Granulozyten und Lymphozyten*

Zeit	Ausgangswert	1 Stunde nach Colchicin	1 Stunde 30 Min. nach Colchicin	2 Stunden nach Colchicin	3 Stunden 30 Min. nach Colchicin	4 Stunden 30 Min. nach Colchicin
Gesamtzahl der Leukozyten	8350	4025	2875	2725	3600	4575
Leukozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	48	34	**33**	43	55
Granulozyten	1795	322	287	286	738	778
Granulozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	18	16	**16**	41	43
Lymphozyten	6470	3660	2573	2484	2826	3774
Lymphozyten in Prozenten des Ausgangswerts	100	56	40	**38**	43	58

Bei allen Meerschweinchen kommt es bei genügend langer Dauer des Versuchs zum Auftreten von Normoblasten, vereinzelt auch von Erythroblasten und Mitosen von Erythroblasten. Wir fanden bei dem Tier W mit 5,5 Normoblasten und 3 Erythroblasten auf 100 weiße Zellen die größte Zahl roter Vorstufen. Dieses Tier wies auch noch 6 Stunden 10 Min. mit 3 Myelozyten und 2,5 Metamyelozyten auf 100 reife Zellen die höchsten Werte weißer Jugendformen auf.

Auch beim Meerschweinchen fällt eine verschiedene Färbbarkeit der Granulozyten auf. Neben dunklen, pyknotischen Segmentkernigen finden sich lockere Zellkerne von geringerer Färbbarkeit. Wir vermuten, daß dieses verschiedene färberische Verhalten als eine Einwirkung des Colchicins auf den Zellkern, aber auch als Zeichen der überstürzten Ausschwemmung der Granulozyten zu werten ist.

Bei 2 Meerschweinchen beobachteten wir das Auftreten von Riesenzellen, die nicht mit den beim Meerschweinchen auch im normalen Blutbild nachweisbaren Riesenformen der Granulozyten zu verwechseln sind. Jene nach Colchicin zu beobachtenden Zellen sind gekennzeichnet durch große gelappte, aber auch bizarr verunstaltete Kerne, die eine feine netzartige Struktur ohne erkennbare Nukleolen aufweisen. Das Plasma erscheint zart basophil, eine Granulation war nicht nachweisbar. Im Protoplasma solcher Riesenformen fanden sich auch vereinzelt Vakuolen. Auch hier besteht die Frage, ob nicht im Colchicin die Ursache dieser Zellbildungen zu suchen ist.

In Leberabstrichpräparaten konnten wir wiederholt den Nachweis der Phagozytose von Segmentkernigen durch Makrophagen erbringen.

Die leukopenische Phase nach Colchicin. Die Bestimmung der absoluten Zahlen der Granulozyten und Lymphozyten zeigt, daß ein Granulozytenabfall in erster Linie für die Veränderungen der Gesamtleukozytenzahlen in den ersten 2 Stunden nach Colchicin verantwortlich

des Tieres V, 310 g, 1,29 mg Colchicin/kg Meerschweinchen subkutan.

5 Stunden 30 Min. nach Colchicin	6 Stunden 30 Min. nach Colchicin	8 Stunden nach Colchicin	9 Stunden nach Colchicin	10 Stunden nach Colchicin	11 Stunden nach Colchicin	12 Stunden nach Colchicin	13 Stunden nach Colchicin	14 Stunden nach Colchicin
5000	5125	6700	9175	8750	6925	7450	10425	9525
60	61	80	109	104	83	89	125	114
1575	1996	3484	3349	3456	3566	3775	4637	4000
88	111	194	189	193	198	210	258	223
3425	3152	3182	5688	5294	3289	3631	5731	5429
53	49	49	88	82	51	56	88	84

ist, daß aber auch dem Absinken der Lymphozyten bei vielen Tieren eine wesentliche Bedeutung zukommt. Auch in jenen Versuchsergebnissen, in denen der Abfall der Gesamtleukozyten noch nicht als eindeutig anzusprechen ist, zeigen die absoluten Zahlen der Granulozyten signifikante Abnahmen. Die tiefsten Werte der Granulozyten schwanken bei der Maus zwischen 13 und 37% des Ausgangswerts, beim Meerschweinchen zwischen 14 und 49%.

Die Genese dieser anfänglichen Granulozytopenie nach Colchicin läßt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu. Die Blutfülle der abdominellen Organe, die besonders von der 5. Stunde nach der Verabreichung des Alkaloids sich in einer starken Injektion des Peritoneums und des Darms manifestiert, läßt an die Möglichkeit einer sich schon in den ersten Stunden nach Colchicin entwickelnden Verteilungsleukozytose denken. Auch die zur selben Zeit regelmäßig nachweisbare Engerstellung der Ohrgefäße (die Ohren fühlen sich kühl an), könnte für diese Annahme sprechen. E. F. MÜLLER, der eingehend die Fragen der Verteilungsleukozytose bearbeitete, nimmt z. B. an, daß durch eine Entzündung in den Abdominalorganen eine lokale Leukozytose entsteht, die über das vegetative Nervensystem auf entfernte Organe einwirkt und durch die splanchnoperipheren Korrelationen eine Verengerung der Gefäße in der Peripherie, und damit eine Leukopenie hervorruft. In ganz entsprechender Weise wird durch eine lokale, periphere Entzündung eine Anhäufung der Leukozyten in der Peripherie bei gleichzeitiger Leukopenie der inneren Organe erklärt.

Colchicin, das nach den pharmakologischen Untersuchungen als Kapillargift angesprochen wird, zeigt auch nach klinischen Erfahrungen eine besondere Affinität zum Intestinaltrakt. Nach Untersuchungen von LETTRÉ und LUTZE ist mit der Möglichkeit der Rückresorption des auch i.p. injizierten Colchicins aus dem Darm, einem der Hauptausscheidungsorte des Gifts, zu rechnen. Diese Beobachtungen erklären die auffallende Blutfülle des Abdomens als Zeichen der Abwehr und eventuell der Rückresorption subkutan verabreichten Alkaloids. Besondere Beweiskraft für die Annahme, daß im Darm ein Hauptangriffspunkt des Gifts zu suchen ist, kommt den Untersuchungsergebnissen LUDFORDs zu. Er betont, daß bei colchicinvergifteten Mäusen der Dünndarm das geeignetste Objekt darstelle, um die Blockade der Mitosen zu demonstrieren, daß "the lumina oft the crypts sometimes appear to be completely filled with cells held up in division." Wir haben also mehrere Voraussetzungen für das Zustandekommen einer Abdominalleukozytose, die in der Lage wäre, eine Verschiebungsleukozytose herbeizuführen, die sich peripher in der leukopenischen Phase manifestiert.

Gegen die Verteilungsleukozytose als Ursache der Leukozytenbewegungen nach Colchicin ist anzuführen, daß das Alkaloid der Herbstzeitlose nach subkutaner Verabreichung Entzündungen im Unterhautgewebe, ja Nekrosen hervorruft. Wir müßten also danach eine periphere Leukozytose, eine abdominelle Leukopenie erwarten, das Gegenteil des von uns beobachteten Verlaufs. Darüber hinaus finden wir zur Zeit der autoptisch nachweisbaren Blutfülle des Abdomens auch peripher, trotz der Engerstellung der Ohrgefäße, eine Leukozytose. Daß diese auch nach den Ergebnissen unsrer Knochenmarkuntersuchungen nicht als Verschiebungsleukozytose gewertet werden kann, sei bereits hier erwähnt.

In mehreren Untersuchungsreihen hat Faludi 1938 erneut die Frage der Verteilungsleukozytose untersucht. Er findet, daß weder die von E. F. Müller geforderte, in Ruhe durch die Arbeit der Abdominalorgane entstehende Abdominalleukozytose nachweisbar ist, noch daß während der ausgeprägten Leukopenie nach intravenösen Injektionen von Colibazillen beim Kaninchen eine verschiedene Leukozytenverteilung zwischen Peripherie und den einzelnen Organen besteht. Die Gesamtleukozytenzahlen und die qualitativen Untersuchungen zeigten in den verschiedensten arteriellen und venösen Gefäßabschnitten, in Leber und Milz auffallende Übereinstimmung.

Nach den Untersuchungen Hoffs, Wallbachs und Faludis kommt eine leukopenische Phase bei der Verabreichung verschiedenster Bakterien und Bakteriengifte (Pyrifer, Coli, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken) zustande. Sie gleicht weitgehend den von uns nach Colchicin erhaltenen Leukozytenbewegungen. Faludi findet z. B. nach intravenöser Verabreichung von 2 Milliarden lebender Colibazillen beim Kaninchen bei einem Ausgangswert von 7700 Leukozyten mit 4389 Granulozyten nach 1 Min. einen Abfall auf 3000—630, nach 2 Min. 1100—55, nach 3 Min. 900—36 bei der Blutentnahme aus einer Ohrvene. Dabei beobachtete er auch einen eindeutigen Abfall der Lymphozyten. Voraussetzung zu diesen Leukozytenbewegungen war die direkte Berührung der Blutzellen mit den eingebrachten Bakterien. Nach den Untersuchungen Faludis ist die Ungestörtheit der Blutzirkulation entscheidend, die Unversehrtheit des vegetativen Nervensystems nicht die Voraussetzung für das Zustandekommen der Leukopenie. Analoge Leukozytenreaktionen — Leukopenie und das Nachfolgen einer Leukozytose — treten auch nach Verabreichung von artfremdem Eiweiß (Seeliger und Gorke, Wallbach) und nach intravenöser Injektion von Trypanblau (Faludi) auf. Auch die von Staub, Mezey und Golandas nach intravenöser Zufuhr von kolloidalen Kohlenhydraten beobachtete Leukopenie, auch die Lymphozyten wiesen in ihren absoluten Werten einen Abfall auf,

ist in einer Reihe von Untersuchungen von einer Leukozytose gefolgt. Staub sieht das Gemeinsame dieser eine Leukopenie verursachenden Stoffe (Glykogen, Stärke, Gummi arabicum) in ihrem großen Molekulargewicht (60000—900000) und in ihrem großen Molekularvolumen. Die durch diese Stoffe hervorgerufene Volumenzunahme oder Versteifung der Plasmastruktur der Granulozyten erklären nach Staub die Passageerschwerung und die Zurückhaltung der Zellen, vorwiegend in den Lungengefäßen. Die festgehaltenen Granulozyten werden, nach am Starlingschen Herz-Lungenpräparat gewonnenen Ergebnissen, später wieder freigegeben.

Während diese Deutungsversuche auch für die von Wallbach und Faludi durchgeführten Untersuchungen mit Bakterien und Bakteriengiften zutreffen können, ist sie für Colchicin, das ein Molekulargewicht von 399,4 besitzt, nicht anzunehmen. Ob jedoch das Colchicin mit dem Eiweiß der Zellen eine hochmolekulare Verbindung eingeht, ist uns nicht bekannt.

Einen massiven Leukozytensturz im peripheren Blut beobachteten auch Jürgens und Studer 1 Stunde nach dem Infusionsbeginn stark verdünnter Thrombinlösungen im Tierversuch. Die Autoren nehmen nach ihren Untersuchungen eine Leukozytenverschiebung an: sie finden die Lungen dicht mit Leukozyten infiltriert.

Jucker beschreibt nach intravenösen Injektionen von Heparin beim Kaninchen das Auftreten einer Leukopenie, die nach 3—4 Min. die tiefsten Werte erreicht. Auch hier tritt bei einer Reihe von Versuchen, die zeitlich genügend lange fortgesetzt wurden, eine Leukozytose auf. Auch Jucker diskutiert die Erklärung Staubs, d. h. die Abhängigkeit der entstehenden Leukopenie von der Größe des Molekulargewichts. Er hält jedoch die Deutung von Fahraeus, der in einer Änderung der Suspensionsstabilität des Bluts die Ursache der Leukopenie sieht, für wahrscheinlicher.

Faludi kommt in seinen Untersuchungen auf die von Löwit und Wallbach gegebene Erklärung über das Zustandekommen einer Leukopenie zurück. Er sieht die Ursache des Abfalls in der Vernichtung der Granulozyten. Durch Transfusionen von Leukozyten suchte er diese Annahme zu beweisen. Er injizierte Kaninchen arteigene, nach dem Vorgehen von de Haans gewonnene, mit Karmin bereits i.p. angefärbte Leukozyten intravenös und beobachtete keine Zunahme, sondern einen Abfall, gleichsinnig, nur graduell verschieden der Leuko- und Granulozytopenie, wie er sie nach Bakteriengaben erhalten hatte. Die mit Karmin gefärbten Leukozyten konnten in den Kapillaren der Lunge und der Leber als untergehende Zellen nachgewiesen werden.

Die *leukozytotische Phase nach Colchicin.* Der Anstieg der Leukozyten- und Granulozytenzahlen bei der Maus beginnt etwa $1^1/_2$ Stunden,

beim Meerschweinchen zwischen $1^1/_2$ und $2^1/_2$ Stunden nach Colchicin. Wir finden bei der Maus Steigerungen bis auf 469 und 620%, beim Meerschweinchen bis auf 226 und 329% des Gesamtleukozytenausgangswerts. Bei beiden Tiergattungen finden wir eine Linksverschiebung mit unreifen Vorstufen im peripheren Blut.

Mit derselben Regelmäßigkeit beobachteten Hoff nach Pyrifer, Wallbach und Faludi nach Bakteriengaben beim Kaninchen einen Anstieg der Leukozyten. Wesentlich ist der Hinweis Faludis, daß in allen untersuchten Stromgebieten die Gesamtleukozytenzahl und die qualitativen Verhältnisse übereinstimmen. Die von ihm nach intravenösen Gaben von Trypanblau erhaltenen Leukozytenbewegungen sind am ehesten mit den von uns gewonnenen Ergebnissen absolut vergleichbar. Bei einem Ausgangswert von 6500 Leukozyten mit 3640 Granulozyten beobachtet er nach 30 Min. einen Abfall auf 2000—320, nach 3 Stunden eine Zunahme auf 10100—7373.

Wie Wallbach sieht auch Faludi im Untergang der Leukozyten die Ursache der Leukopenie, in den bei der Zerstörung frei werdenden Stoffen den die Leukopoese regelnden Faktor. Diese Erklärung könnte auch eine Deutung der von uns nach Colchicin beobachteten Leukozytenbewegungen geben. Uns erscheint jedoch aus den Untersuchungsergebnissen Faludis ein Einwand gegen diese Annahme zu erwachsen: Wenn das Ausmaß der Leukozytose von der Menge der aus den zugrunde gehenden Leukozyten frei werdenden leukeretischen Stoffen abhängig ist, müßte man erwarten, daß bei in derselben Zeit gleich starkem Absinken der Leukozyten auch der zeitliche Ablauf der Leukozytose gewisse Übereinstimmungen zeigt. Aus den Protokollangaben Faludis geht aber hervor, daß nach einer intravenösen Verabreichung von Trypanblau und nach einer intrapulmonalen Injektion von Colibazillen die Leukopenie nach 30 Min. einen Tiefstwert von 2000 bzw. 2300 Zellen bei einem Ausgangswert von 6500 bzw. 7000 erreicht. Die 3 Stunden nach Trypanblau nachgewiesene Leukozytose wird aber nach der Verabreichung der Colibakterien erst nach einem Ablauf von 2—3 Tagen in einem vergleichbaren Ausmaß erreicht. Wir glauben nicht, daß eine solch erhebliche Diskrepanz, die bei den weiteren Protokollangaben in analoger Weise in Erscheinung tritt, mit einer verschiedenen Empfindlichkeit der Kaninchen in Zusammenhang gebracht werden kann.

Wir sind nach den von uns erhobenen Befunden nicht in der Lage, den Untergang der Leukozyten als Ursache der nach Colchicin auftretenden Leukopenie und der nachfolgenden Leukozytose zu beweisen. Die verschiedene Färbbarkeit des Chromatins der Segmentkernigen und der Lymphozyten, die Bildung von dunkler gefärbten Chromatinschollen in beiden Zellarten, eine Beobachtung, die auch von Pirwitz

gemacht wurde, der wiederholte Nachweis der Phagozytose der Segmentkernigen in Leberabstrichpräparaten rechtfertigen den Verdacht eines beschleunigten Abbaus und vermehrten Untergangs. Auch das Auftreten von Zellen bei beiden Tiergattungen, deren Kerne sich als stark färbbare, strukturlose Kugeln darstellen, deren Protoplasma einzelne, verklumpte Granula zeigt, kann in dieser Weise gewertet werden. Die von uns gewonnenen Bilder gleichen den von HEILMEYER und von MUTIUS, sowie von LÜBBERS beschriebenen Leukozytenabbauformen, vor allem seinem Typ A, B und C. Wir geben aber zunächst diese Beobachtungen wieder, ohne weitere Schlußfolgerungen zu ziehen.

Es erscheint uns bedeutungsvoll, daß A. P. DUSTIN bereits 1935 von den von uns diskutierten Stoffen, die hämatologisch durch das Auftreten einer Leukopenie gekennzeichnet sind, neben dem Colchicin auch Bakterientoxine, artfremdes Eiweiß, Pepton und Trypanblau unter seine „poisons caryoclasiques" aufgenommen hat. Sollte diese von DUSTIN für diese heterogenen Stoffen entdeckte gemeinsame biologische Bedeutung auch das gleichgerichtete Verhalten auf die Leukozyten der Peripherie erklären? Wir sehen dabei den Angriffspunkt dieser karyoklastischen Substanzen nicht nur in der morphologisch nachweisbaren Einwirkung auf die teilungsbereite Zelle, sondern auch in der Veränderung der Eiweiß- bzw. Kernsubstanz der ruhenden bzw. ausgereiften Zelle.

Das normale Knochenmark der weißen Maus. Die nach der Spaltung des Femurs gewonnenen Markbilder gesunder Tiere unterscheiden sich von den nach Markpunktion angefertigten Präparaten erheblich. Die Ausstriche sind außerordentlich zellreich, die Elemente des Marks liegen in großen Verbänden, Zelle neben Zelle, ohne Beimengung von Erythrozyten. Versuche, das so gewonnene Mark dünner auszustreichen, führten zu zahlreichen geschädigten und nicht mehr differenzierbaren Zellen. Die in der Mitte des Verbands liegenden Zellen nehmen Farbstoffe sehr viel schlechter auf oder sie sind stark überfärbt. Die Chromatinstruktur, insbesondere aber die Granulation des Protoplasmas kommt nur schlecht zur Darstellung. Überdies liegen diese Zellen entrundet, wie Mosaiksteine verschiedener Form nebeneinander, so daß wir über ihre Größe, über das Kernplasmaverhältnis an solch dichten Stellen keine bindenden Aussagen geben können. Die verschiedene Auslösbarkeit der einzelnen Zellformen aus den gewonnenen Markbröckelchen verlangt Beachtung. Schwer und damit sehr ungleich lösen sich die Zellen des Retikulums. Wir finden häufig ganze Inseln von Retikulumelementen, die das Gesichtsfeld beherrschen. Wir sind also bei der Auszählung darauf angewiesen, die Randpartien und die dünnen Stellen des Ausstrichs aufzusuchen, die besonders die reifen Elemente enthalten.

Wir haben uns an die von NAEGELI gegebene Nomenklatur gehalten. Die Granulozytenreihe zeigt die Charakteristika der aus der menschlichen Hämatologie bekannten Zellformen. Es kommen jedoch die Granula, die viel weniger zahlreich sind als beim Menschen und bei anderen Tieren (z. B. beim Meerschweinchen), nur schlecht zur Darstellung. Dabei ist die Promyelozytengranulation wesentlich klarer sichtbar als die der reifen Elemente. Die Färbbarkeit des Protoplasmas nimmt mit zunehmender Reife ab. Manche Markbilder zeigen bei normaler Beleuchtung in einer kreisrunden „Höhle" einen wohlstrukturierten, färberisch gut dargestellten Kern eines Stab- oder Segmentkernigen, erst bei stärkerer Abblendung erkennt man einzelne Granula in einem eben angefärbten Protoplasma.

Bei unsren Kontrolltieren fanden wir wiederholt, ganz ausgesprochen bei 2 Tieren, ringkernige Granulozyten. PAPPERITZ vertritt die Anschauung, daß der runde Kern des Myelozyten sich zur Stabform einbuchtet, daß seine Enden sich dann zur Ringform zusammenschließen. Auch wir finden nach dem Reifegrad des Kerns und des Protoplasmas auffallend gestreckte, lange ringförmige Stabkernige, deren Enden sich berühren oder übereinander gelagert sind. Nach den von uns gewonnenen Bildern halten wir es jedoch für möglich, daß es sich hier nicht um einen Zusammenschluß zur Ringform, sondern um die Lösung des bisher geschlossenen Ringes handelt. Wir sahen Promyelozyten, deren runder Kern zentral eine kleine Aufhellung aufwies, von der wir aber nach der Häufigkeit und den verschiedenen Übergangsbildern annehmen müssen, daß es sich hier weder um Kunstprodukte noch um eine Vakuole handelt. In der weiteren Entwicklung wird der Ringmantel schmäler, der umschlossene, von Protoplasma erfüllte, Granula enthaltende Hohlraum größer. Diese Übergänge vom Promyelozyten bis zum Ringstabkernigen sind also nicht nur durch das Reifen des Chromatins und des Protoplasmas, sondern auch durch das Größerwerden des umschlossenen Hohlraums gekennzeichnet[1].

Die roten Vorstufen zeigen einen auffallend kleinen, plasmaarmen, aber basophilen Erythroblasten. Polychromatische Zellen sind vereinzelt, hämoglobinhaltige Normoblasten selten nachweisbar. Eine Besonderheit der weißen Maus, auf die bereits ØRSKOV hingewiesen hat. In Tabelle 7 haben wir die von 5 Kontrolltieren aus insgesamt 2000 Zellen der myeloischen Reihe gewonnenen Durchschnittswerte und

[1] Nach Abschluß dieser Arbeit finden wir bei TÖPPNER, Fol. haemat. (D.) **66**, 48 (1942) eine Beschreibung der ringkernigen Leukozytenentwicklung für die weiße Laboratoriumsratte, die völlig unsrer Auffassung entspricht. Auch TÖPPNER konnte bis zu den Promyelozyten diese Ringbildung nachweisen. In einer weiteren Arbeit, Z. exper. Med. **109**, 369 (1941) bringt TÖPPNER sehr gute Mikrophotogramme, welche den von uns beobachteten Bildern entsprechen.

die Schwankungsbreite der einzelnen Zellformen angegeben. Wir errechneten nach der von H. E. BOCK beschriebenen Methode die granulopoetische Reifungszahl, sie schwankt bei unsren Kontrolltieren zwischen 273 und 296.

Knochenmark der weißen Maus nach Colchicin. In Analogie zu den in vivo und vitro gewonnenen Ergebnissen erwarten wir unter der Colchicineinwirkung auf Grund der Ablaufshemmung und Fixation der Teilungsvorgänge eine Anhäufung blockierter Mitosen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer des Alkaloids. Nach hämatologischen und am Explantat durchgeführten Untersuchungen (ROHR, MÖSCHLIN, LETTRÉ) ist anzunehmen, daß nach einer Ruhezeit von 24 Stunden sich die Kernteilung in 30—50 Min. vollzieht. In dieser in Rhythmen ablaufenden Teilungsphase greift das Colchicin nach LETTRÉ nicht unmittelbar an den Chromosomen selbst, sondern am achromatischen Teilungsapparat der Zelle an und verhindert in der Metaphase den weiteren Ablauf der Mitose.

Die Knochenmarkausstriche der vergifteten Mäuse lassen einheitliche, in ihrer Intensität von der Dauer der Colchicineinwirkung abhängige Veränderungen erkennen (s. Abb. 4—7). Wir beobachten bereits in den ersten Stunden nach Colchicin eine Verschiebung des Verhältnisses R zu W zugunsten der Erythropoese infolge der Abnahme der reifen Zellen der weißen Reihe. In den später gewonnenen Präparaten wird die Verarmung an reifen Zellformen besonders deutlich, es findet sich eine Zunahme der unreifen Zellelemente. Mit Verlängerung der Wirkungsdauer tritt die Destruktion des Marks immer stärker in den Vordergrund.

In allen Knochenmarkpräparaten kommen Zellen in Mitose zur Darstellung. Ihre Zahl nimmt in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer zu. Es sind jedoch nur vereinzelte, sich in der Prophase befindende Teilungsfiguren einzuordnen. Alle anderen weisen die Zeichen schwerster Schädigung auf. Wir beobachten die völlige Auflösung des metaphasischen Verbands. Die Struktur, das normale Bild einer Mitose, ist in keiner Zelle erkennbar. Die chromatischen Einheiten sind zu bröckligen Bruchstücken zerfallen und zeigen pyknotische Veränderungen. Abgerundete Chromosomentrümmer erfüllen vielfach das Zytoplasma der Zelle oder sie sind durch das Ausstreichen in die Umgebung verschleppt.

Die sich nicht in Teilung befindenden Zellen weisen ebenfalls Zeichen einer Schädigung auf. Ihre Kernstruktur erscheint aufgelockert, das Chromatin ist schlechter färbbar. Es finden sich Vakuolen im Kern, häufiger noch im Protoplasma. Freiliegende Kernreste in Form stark färbbarer strukturloser Kugeln werden nachweisbar. Das Mark zeigt eine auffallende Linksverschiebung.

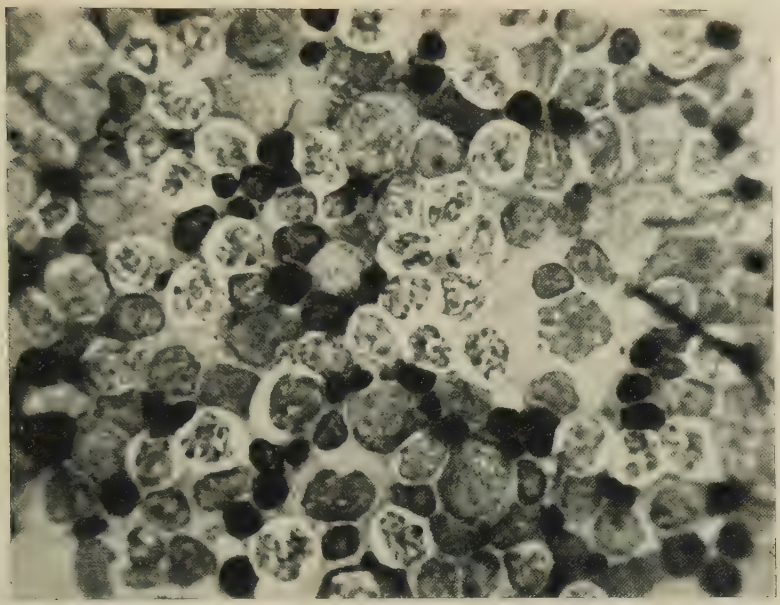


Abb. 4. Knochenmarksbild der Maus II (6,25 mg Colchicin/kg) 1 Stunde 50 Min. nach der Vergiftung.

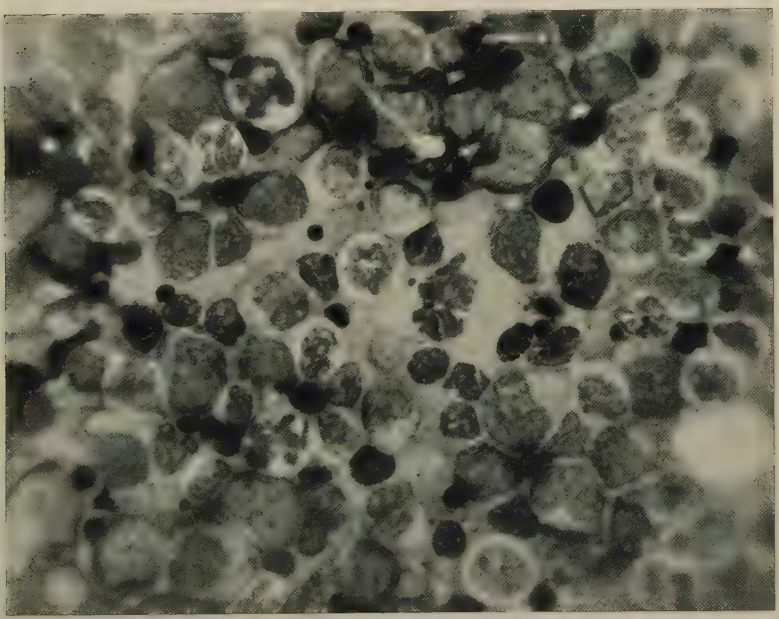


Abb. 5. Knochenmarksbild der Maus V (6,25 mg Colchicin/kg) 4 Stunden nach der Vergiftung.

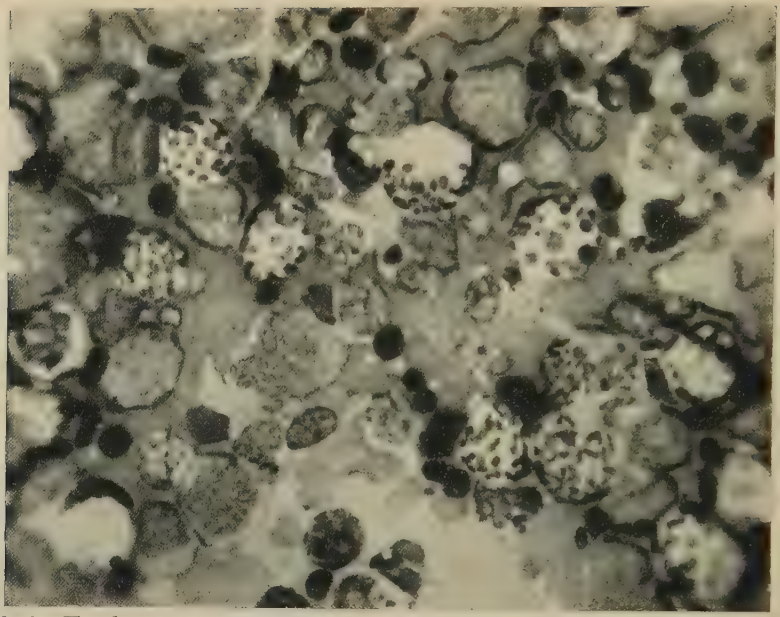


Abb. 6. Knochenmarksbild der Maus K (6,25 mg Colchicin/kg) 16 Stunden 55 Min. nach der Vergiftung.

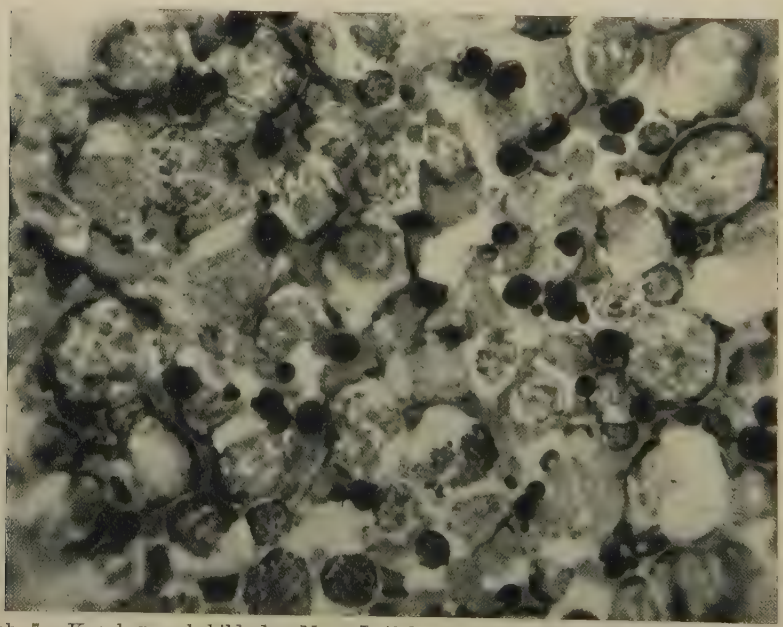


Abb. 7. Knochenmarksbild der Maus J (6,25 mg Colchicin/kg) 18 Stunden 55 Min. nach der Vergiftung. Die Vergrößerung aller Mikrophotogramme ist 1000fach.

Wir haben jeweils 400 Zellen der Myelopoese und der Retikulumelemente mit den auf sie entfallenden Mitosen gezählt. Die in Tabelle 7 wiedergegebenen Myelogramme erhielten wir nach dem Vorgehen H. E. Bocks durch Ergänzung auf 400 Granulozyten, die Zellen in Mitose wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die hieraus errechneten Reifungszahlen stellen also durch den Wegfall der gerade sich in Teilung befindlichen jugendlichen Elemente Mindestwerte dar.

Auch die Zellen der Erythropoese zeigen zahlreiche Mitosen. In noch ausgeprägterem Maße finden sich hier die Zeichen der Pyknose in Form zusammengesinterter chromatischer Einheiten ohne erkennbare Struktur.

Das normale Knochenmark des Meerschweinchens. Die bei der weißen Maus geschilderten, durch die Art der Markgewinnung bedingten Schwierigkeiten haben auch für das Meerschweinchen Gültigkeit. Durch die Pseudoeosinophilie der myeloischen Elemente sind die Zellen in besonderem Maße charakterisiert. Ungranulierte Zellen, die nach Klieneberger in den Präparaten

Tabelle 7. *Myelogramme der weißen Maus nach verschieden langer Einwirkung von Colchicin (6,25 mg/kg).* Die niederen Werte der Segmentkernigen bei den gesunden Mäusen sind durch die Tiere mit ringkernigen Granulozyten erklärt.

	N 1 Std 5 min nach Colchicin Std u. min	II 1 Std 50 min nach Colchicin Std u. min	V 4 Std nach Colchicin Std u. min	P 14 Std 5 min nach Colchicin Std u. min	K 16 Std 55 min nach Colchicin Std u. min	J 18 Std 55 min nach Colchicin Std u. min	Myelogramm der Kontrolltiere	
							Mittelwert aus 2000 Zellen	Schwankungsbreite
Myeloblasten . . .	5,75	3,50	6,25	5,50	7,75	7,00	3,62	2,5—4,5
Promyelozyten . . .	7,75	6,75	11,50	14,75	20,25	15,00	6,12	5,0—7,0
Myelozyten	32,75	35,25	32,25	55,00	49,25	56,75	23,81	20,5—30,0
Metamyelozyten . .	13,50	15,50	21,50	14,25	16,25	10,75	13,46	8,5—16,0
Stabkernige	27,50	30,25	24,75	10,00	5,25	9,00	43,43	36,0—50,5
Segmentkernige . .	12,75	8,75	3,75	0,50	1,25	1,50	9,56	4,0—17,5
R : W	33/100	30,5/100	30,5/100	44/100	55/100	60,75/100	12,18/100	10,5—15,5/100
Granulocyten Reifungszahl . .	3125	311,5	351,75	400,0	405,25	395,75	284,36	273—296
Zahl der Mitosen auf 400 Zellen der Myelopoese und der Retic. Elemente .	1,0	5	11	43	96	85	0,4	

Tabelle 8. *Myelogramme des Meerschweinchens nach verschiedener langer Einwirkung von Colchicin.*
Eine Differenzierung der Markbilder der Tiere S und R (0,79 mg/kg und 0,60 mg/kg), die 20 und 24 Stunden nach der Vergiftung getötet wurden, ist nicht mehr möglich.

	Q 2 Std 20 min nach Colchicin Std u. min	O 8 Std nach Colchicin Std u. min	W 8 Std nach Colchicin Std u. min	V 14 Std nach Colchicin Std u. min	U 14 Std nach Colchicin Std u. min	Myelogramm der Kontrolltiere	
						Mittelwert aus 2400 Zellen	Schwankungsbreite
Myeloblasten	5,75	7,25	3,00	5,75	8,50	3,70	3,25—4,25
Promyelocyten	8,25	11,75	10,50	8,25	12,75	6,90	5,75—7,50
Myelozyten	20,00	50,75	48,50	57,75	35,75	15,70	13,50—17,50
Metamyelozyten	11,75	16,75	18,50	13,00	9,25	10,45	6,00—15,00
Stabkernige	38,50	12,75	17,5	12,75	26,25	47,05	40,50—56,00
Segmentkernige	7,75	0,75	2,00	2,50	8,50	15,20	9,50—25,75
R : W	66/100	78,5/100	71/100	38,25/100	41 5/100	26.3/100	14—44/100
Granulozyten Reifungszahl	307,75	381,75	357,00	373,75	348,50	245,45	230,5—273
Zahl der Mitrosen auf 400 Zellen der Myelopoese und der Ret. Elemente	15	21	13	17	22	0,66	

die Hälfte aller Knochenmarkelemente darstellen, gehören unseres Erachtens den Retikulumzellen an. Die Granulation der myeloischen Formen ist zart pseudoeosinophil und klar zu erkennen. Die in wechselnder Zahl nachweisbaren Eosinophilen zeigen grobe, leuchtende Granula.

Die Erythropoese unterscheidet sich erheblich von den bei der weißen Maus nachweisbaren morphologischen Besonderheiten. Wir finden beim Meerschweinchen große und kleine Erythro- und Normoblasten. Von 6 Kontrolltieren haben wir insgesamt 2400 Zellen der myeloischen Reihe ausgezählt. In Tabelle 8 geben wir die hieraus gewonnenen Durchschnittswerte und die Schwankungsbreite an.

Das Knochenmark des Meerschweinchens nach Colchicin. Auch die Markbilder der vergifteten Meerschweinchen lassen die bei der weißen Maus beschriebenen Veränderungen in derselben Weise erkennen. Auch hier ist die Abhängigkeit von der Dauer der Colchicineinwirkung deutlich.

Es kommt zu einer raschen Abnahme der reifen, ausschwemmungsbereiten Zellformen und damit zu einer Verschiebung des Verhältnisses R zu W zugunsten

der Erythropoese. Es ist auffallend, daß die Zahl der beim Meerschweinchen nachweisbaren Zellen in Mitose eine geringere ist als bei der weißen Maus. Bei den Tieren R und S steht die Karyorhexis ganz im Vordergrund. Wir sehen bizarre Kerndeformierungen neben zusammengesinterten strukturlosen Kernmassen, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem Teil Mitosen entsprechen dürften. Es finden sich ferner Zellen mit strukturlosen Chromatinkugeln, die zum Teil noch durch haardünn ausgezogene Brücken verbunden sind. Häufig liegen diese Chromatinkugeln frei zwischen den Zellen. Auch in den noch erhaltenen Zellelementen erscheint das Chromatin oft schollig aufgelockert und schlechter färbbar im Vergleich zu den Kontrollbildern und jenen Knochenmarkausstrichen, die nach einer kürzeren Einwirkungsdauer des Colchicins gewonnen wurden. In manchen Zellen finden sich verklumpte Granula und auch Vakuolenbildung im Kern und im Protoplasma.

Nur vereinzelt sehen wir jedoch jene von Chromosomenbruchstücken erfüllten Zellen, wie wir sie bei der weißen Maus beobachten konnten und in Abb. 6 und 7 zur Darstellung bringen. Ob diese Unterschiede zwischen den beiden Tiergattungen nur von der Dosierung des Gifts abhängig sind, werden wir in weiteren Untersuchungen zu klären versuchen. Brues und Cohen haben bei ihren Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber darauf hingewiesen, daß hohe Dosen von Colchicin eine Abnahme der Zahl der gestoppten Mitosen ergeben. Bei der schweren Destruktion des Marks, die wir beim Meerschweinchen beobachten, ist also besonders mit dieser Möglichkeit zu rechnen.

Knochenmark und peripheres weißes Blutbild. Die im peripheren Blut und im Knochenmark nachweisbaren Bewegungen der Granulozytenzahlen lassen erkennen, daß unter der Einwirkung des Colchicins eine über Stunden zu verfolgende Ausschwemmung reifer Elemente aus den Blutbildungsstätten einsetzt. 1 Stunde nach Colchicin, also zur Zeit der leukopenischen Phase der Peripherie, wird bereits diese Abwanderung der reifen myeloischen Zellen sichtbar. Wir halten es für unwahrscheinlich, daß beim Zerfall der Granulozyten freiwerdende leukeretische Substanzen die Ursache dieser Knochenmarkreaktion sind. Es entwickelt sich eine schwere Störung des normalerweise zwischen Mark und Peripherie bestehenden Gleichgewichts. Ein Vergleich der kurz vor der Tötung nachgewiesenen Leukozytenzahlen mit den entsprechenden Knochenmarkbildern zeigt uns die resultierende Verschiebung: Die Maus J weist 18 Stunden nach Colchicin noch eine Leukozytengesamtzahl von 424, eine Granulozytenzahl von 494% des Ausgangswerts auf, im Knochenmark finden wir nur noch 9,5% Stab- und 0,5% Segmentkernige. Die entsprechenden Zahlen

für das Meerschweinchen V, 14 Stunden nach Colchicin, sind 114 und 223% für das periphere Blutbild, im Knochenmark zählen wir 12% Stab- und 1% Segmentkernige.

Wiederholt beobachteten wir in der 19.—25. Stunde nach Colchicin einen Abfall der leukozytotischen Werte auf und unter den Ausgangswert. Lettré konnte an der Gewebekultur mit Hilfe von Organextrakten colchicinvergifteter Mäuse mit einer Empfindlichkeit von 0,01—0,04 γ/cm^3 nachweisen, daß (nach intraperitonealer Verabreichung von 100 γ) 16 Stunden später eben noch eine Ausscheidung aus Leber und Darm feststellbar ist. Es ist also möglich, daß der Wegfall des gesetzten Reizes die Ursache dieses Leukozytenabfalls ist. Die bei diesen Tieren (Meerschweinchen S und R) vorhandene besonders schwere Destruktion des Marks (eine Differenzierung der Markbilder ist nicht mehr möglich) läßt uns aber in erster Linie an eine Markzerstörung und Erschöpfung als Ursache dieses Abfalls denken.

Auf dem Wege zu diesen Bildern ausgesprochener Nekrobiose finden wir alle Übergänge. Die Zunahme der unreifen Vorstufen, die fast gleichbleibende Zahl der Metamyelozyten sind Kriterien der Abwanderung der reifen Elemente. Es kommt im Laufe der Vergiftung zum Bild einer Linksverschiebung des Knochenmarks. Dabei handelt es sich jedoch in diesen Colchicinbildern nicht um eine echte Vermehrung der Jugendformen der Granulopoese, nicht um den Ausdruck einer reaktiven Leistung in Form einer mitotischen Teilung dieser Zellen. Wir sehen in diesen Präparaten nur die passive Folge der Markausschwemmung: Die Ansammlung zurückgebliebener unreifer Knochenmarkelemente.

Die schwere Destruktion des Knochenmarks, insbesondere der teilungsbereiten Zellen, beweist eine direkte lokal angreifende karyoklastische Wirkung des Colchicins. Die Störung der Karyokinese, die gestörte Zellausreifung ergeben zusammen mit der Erschöpfung der Markreserven das Bild der toxischen Schädigung nach letalen Colchicindosen.

Die Deutung der Pathogenese der peripher nachweisbaren Leukozytenbewegungen und der nach Colchicin resultierenden Knochenmarkveränderungen scheint uns eine Trennung der Angriffspunkte des Alkaloids zu erfordern. Wir glauben, trotz aller von uns bereits diskutierten Schwierigkeiten, daß in der Peripherie an den weißen Blutzellen ablaufende und von dort aus in Erscheinung tretende pathologische Vorgänge eine Erklärung für die Granulozytopenie geben. Für die leukozytotische Phase muß aber im direkten Einwirken des Colchicins auf das Knochenmark oder auf einen nervösen (humoral nervösen?) Regulationsmechanismus der Leukopoese eine Deutung gesucht werden. Es sind keine Beweise für eine Abhängigkeit der

leukopenischen-leukozytotischen Phasen von der mitosehemmenden Eigenschaft des Alkaloids zu erbringen. Es handelt sich unseres Erachtens um getrennte Angriffspunkte des karyoklastischen Gifts.

Zusammenfassung.

1. Die im Tierexperiment nach letalen und subletalen, subkutan verabfolgten Colchicingaben nachweisbaren Leukozytenbewegungen sind in erster Linie durch einen 30—90 Min. nach der Vergiftung einsetzenden Abfall der Granulozyten und ihren nach $1^1/_2$—$2^1/_2$ Stunden beginnenden Wiederanstieg zu erklären. Im weiteren Verlauf der Versuche kommt es in jedem Fall zu einer Granulozytose.

2. Die Verfolgung der absoluten Granulozytenzahlen, besonders die Wiedergabe ihrer auf den Ausgangswert bezogenen Prozentsätze, ergibt erst ein klares Bild der granulozytopenischen und granulozytotischen Phasen.

3. Die durch Colchicin hervorgerufenen Blutbildveränderungen lassen die Lymphozyten keineswegs unberührt. Ihr Verhalten ist nicht so einheitlich wie das der Zellen der Granulopoese. Es lassen sich im Verlauf der Lymphozytenbewegungen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Tiergattungen nachweisen: Die lymphozytotischen Werte liegen bei der Maus durchschnittlich höher als beim Meerschweinchen.

4. Die Knochenmarkbilder nach letalen Colchicingaben zeigen einheitliche, in ihrer Intensität von der Dauer der Vergiftung abhängige Veränderungen. Sie beweisen die überstürzte Ausschwemmung der Stab- und Segmentkernigen aus dem Knochenmark, die Erschöpfung der Knochenmarkreserven in zeitlicher Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des Alkaloids.

5. Es kommt in unsren Versuchen zum Bild der vorgetäuschten Linksverschiebung, zur toxischen Schädigung und Destruktion des Marks.

6. Die nachweisbaren Mitosen lassen bei der von uns gewählten Colchicindosierung alle Zeichen schwerster Schädigung erkennen: Auflösung des metaphasischen Verbands, Zerfall der chromatischen Einheiten zu bröckligen Bruchstücken, die das Zytoplasma der Zellen erfüllen, Pyknose.

Beim Meerschweinchen ist die Zahl der Zellen in Mitose wesentlich geringer als bei der Maus. Beim Meerschweinchen steht die Karyorhexis im Vordergrund.

7. Die Wirkung des Colchicins beschränkt sich nicht auf den Angriff an der teilungsbereiten Zelle. Wir nehmen an, daß neben diesem direkten Einwirken auf die Kernteilung weitere Angriffspunkte des Colchicins zur Erklärung der peripheren Leukozytenbewegungen erwogen werden müssen.

Unsere Untersuchungen ergeben keinen Anhalt für die Abhängigkeit der leukopenischen und leukozytotischen Phase von der mitosehemmenden Eigenschaft des Alkaloids.

Literatur.

Beck: Arch. exper. Path. (D.) **165**, 208 (1932). — Bock, H. E.: Klin. Wschr. **1939** II, 1565. — Boros, v.: Klinische Hämatologie. Stuttgart: Ferdinand Enke 1944. — Borsetto: Arch. Farmacol. sper. **68**, 235 (1939). — Ref. Kongr.-zbl. inn. Med. **104**, 465 (1940). — Brodersen: Strahlenther. **73**, 198 (1943). — Brues: J. Physiol. (Brit.) **86**, 1936. Zit. nach Bucher. — Brues and Cohen: Biochem. J. (Brit.) **30**, 1363 (1936). — Bucher: Z. Zellforsch. **29**, 283 (1939). — Das Gupta: Indian J. med. Res. **26**, 947 (1939). — Ref. Kongr.zbl. **102**, 131 (1940). — Dixon and Malden: J. Physiol. (Brit.) **37**, 50 (1908). — Dustin: Arch. exper. Zellforsch. **22**, 395 (1938). — Dustin, jr.: Bull. Acad. Méd. Belg., Brux. **6**, 505 (1941). — Faludi: Fol. haemat. (D.) **59**, 357 (1938). — Goldscheider u. Jakob: Z. klin. Med. **25**, 373 (1894). — Heilmeyer, Merck u. Pirwitz: Klinik und Pharmakologie des Urethans. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsanstalt 1948. — Heilmeyer u. v. Mutius: Klin. Wschr. **1947**, Nr 21/22, 339. — Hoff: Erg. inn. Med. **46**, 1 (1934). — Jucker: Klin. Wschr. **1943**, 221. — Jürgens u. Studer: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 386. — Klieneberger-Carl: Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1927. — Kneedler: J. amer. med. Assoc. **1945**, 272. — Landolt: Dtsch. Arch. klin. Med. **191**, 378 (1943). — Lettré: Naturw. **1946**, 75. — Lettré u. Lutze: Hoppe-Seylers Z. **281**, 58 (1944). — Levison: Z. exper. Med. **76**, 567 (1931). — Löwit: Siehe Wallbach. — Ludford: Arch. exper. Zellforsch. **18**, 411 (1936). — Lübbers: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 518. — Moellendorff, v.: Z. Zellforsch. **32**, 35 (1941). — Moeschlin: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1051. — Müller, E. F., u. Petersen: Klin. Wschr. **1926**, 53, 137. — Orskov: Fol. haemat. (D.) **59**, 145 (1938). — Papperitz: Ber. naturf. Ges. Freiburg i. Br. **37**, 1 (1942). — Paul, Brown u. Limarzi: Zit. nach Landolt. — Pirwitz: Mündliche Mitteilung. — Rohr: Menschliches Knochenmark. Leipzig: Georg Thieme 1940. — Seeliger u. Gorke: Z. exper. Med. **24**, 322 (1921). — Staub, Mezey u. Golandas: Klin. Wschr. **1938** II, 1555. — Tennant u. Liebow: Zit. nach Brodersen. — Wallbach: Z. exper. Med. **82**, 1, 53 (1932). — Fol. haemat. (D.) **58**, 393 (1937). — Widmann: Ärztl. Forsch. **1948**, 457.

Dr. H. Widmann, Tübingen, Hallstattstr. 5.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 243—255 (1949).

Werner Lipschitz †.

Am 1. Februar 1948 starb in Pearl River N.Y. WERNER LIPSCHITZ, der Nachfolger ALEXANDER ELLINGERS auf dem Lehrstuhl der Pharmakologie an der Universität Frankfurt am Main im Jahre 1926.

Dr. Werner Lipschitz

Curriculum vitae.

WERNER LIPSCHITZ ist am 28. 3. 1892 in Berlin geboren. Er legte im März 1910 am Reformgymnasium Kaiser-Friedrich-Schule in

Charlottenburg die Reifeprüfung ab und studierte darnach Medizin und Chemie an den Universitäten Freiburg i. Br., Göttingen und Berlin. Bereits im Jahre 1913 arbeitete er bei MICHAELIS über „Die Säuredissoziationskonstanten der Alkohole und Zucker, insbesondere der Methylglucoside", und im Jahr 1915 promovierte er bei EMIL FISCHER mit einer Arbeit über „Optisch aktive N-Monomethylderivate von Alanin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin" zum Doktor der Philosophie. Noch im selben Jahr legte er sein medizinisches Staatsexamen ab und promovierte im Jahre 1916 an der Universität Leipzig zum Doktor der Medizin. Im ersten Weltkrieg zum Militärdienst eingezogen diente er zunächst 1915/16 als Arzt in der Armee und arbeitete dann 1917/18 in einem Lazarett in der Nähe von Berlin, wobei er gleichzeitig seine Mitarbeit am Chemischen Institut der Universität Berlin bei EMIL FISCHER fortsetzen konnte. 1918 wurde er Assistent am Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M. Hier führte er zunächst eine Arbeit über die Therapie von Giftgaserkrankungen durch, die dem Institut vom damaligen Kriegsministerium übertragen worden war. 1920 habilitierte er sich mit einer Arbeit „Über den Mechanismus der Giftwirkung aromatischer Nitroverbindungen" für das Fach der Pharmakologie an der Universität Frankfurt a. M. 1921 heiratete er eine Tochter des Frankfurter Neurologen LUDWIG EDINGER. Nach dem Tod ALEXANDER ELLINGERS 1923 wurde er stellvertretender Direktor des Instituts und 1925 außerordentlicher Professor. Im Frühjahr 1926 wurde ihm der Lehrstuhl der Pharmakologie und die Leitung des Pharmakologischen Instituts der Universität Frankfurt a. M. übertragen. In der darauffolgenden 7jährigen Amtsperiode war er von 1929—1932 der Schriftführer der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft und 1932/1933 deren Vorsitzender. 1932 wurde er ferner zum Mitglied der Straßburger wissenschaftlichen Gesellschaft erwählt. Die Revolutionsereignisse des Frühjahrs 1933 führten zu einer jähen Beendigung seiner Frankfurter Tätigkeit. LIPSCHITZ nahm einen Ruf als Leiter des neu zu errichtenden Biochemischen Instituts an der Universität Istanbul (Türkei) an. Im Frühjahr 1938 entschloß er sich, seinen 5jährigen Kontrakt hauptsächlich mit Rücksicht auf die Zukunft seiner beiden heranwachsenden Söhne nicht zu verlängern und siedelte nach den Vereinigten Staaten von Amerika über. Für eine mehr als einjährige Übergangszeit sah er sich dort vor die Notwendigkeit gestellt, eine Gaststelle im Department of Experimental Surgery der New York University anzunehmen, um seine Arbeiten fortsetzen zu können. Erst im Sommer 1940 bot sich ihm die Stellung als Pharmakologe bei den Lederle-Werken in Pearl River N. Y. Er beendete diese Tätigkeit mit dem 31. 12. 47, in Verhandlungen über eine Lehr- und Forschungsstelle an der Universität Syracuse N. Y. stehend.

Wenige Wochen später, am 1. 2. 1948, riß ihn der Tod plötzlich aus dem Leben. Die Autopsie ergab: Allgemeine Virusinfektion, doppelseitige Viruspneumonie, Virusencephalitis. Schon 2mal vorher, nämlich im Jahre 1935 und im Jahre 1940, hatte er Viruspneumonien durchgemacht. Der dritten und letzten foudroyant verlaufenden Infektion war er binnen weniger Tage fast reaktionslos erlegen.

Opus.

Das wissenschaftliche Werk von Lipschitz ist gekennzeichnet einerseits durch seine Zuneigung zur chemischen und physikalisch-chemischen Arbeitsweise, andererseits durch die besondere Zielsetzung in den Problemen. Seine Vorliebe für diese beiden Arbeitsrichtungen kommt bereits in den zwei ersten Veröffentlichungen zum Ausdruck. Sie zieht sich dann durch die ganze Frankfurter Arbeitsperiode hindurch und findet in der Tatsache, daß Lipschitz in Istanbul das Institut und den Lehrstuhl für Biochemie übernahm, den stärksten äußeren Ausdruck. Lipschitz hat aber auch den Versuch gemacht, die im wesentlichen mit der Methodik der animalischen Physiologie arbeitende Forschungsrichtung in der Pharmakologie in sein Arbeitsprogramm einzubeziehen und ihr den Raum zu geben, den sie ihrer Bedeutung nach verdient. So hat er unter anderem die Magnusschen Methoden zur Erforschung der Pharmakologie des Zentralnervensystems in das Frankfurter Institut zu verpflanzen versucht. Daß diese Bemühungen nicht die gewünschten Früchte brachten, war wohl die erste größere Enttäuschung im wissenschaftlichen Leben von Lipschitz, das zunächst unter so günstigen Auspizien zu stehen schien.

Lipschitz hatte wenig Neigung, auf dem breiten Wege der pharmakologischen Forschung, auf dem mit den üblichen Methoden die Wirkungsweise neu synthetisierter Stoffe der verschiedenen Arzneimittelgruppen geprüft wird, fortzuschreiten. Sein Ziel bestand immer darin, gleichgültig welchen Stoff er untersuchte, das Wesen der Wirkung am Wirkungsort bzw. den Wirkungsmechanismus aufzuklären. Wie der Forscher der morphologischen Arbeitsrichtung mit Hilfe des Mikroskops die Strukturelemente der Gewebe und der Zelle möglichst bis in alle Einzelheiten zu erfassen sucht, so hat er mit Hilfe eines weit komplizierteren Instrumentes die Zellfunktion, ja womöglich die Funktion von Zellelementen und ihre Änderung unter der Pharmakonwirkung aufzudecken versucht. Als fernes Ziel einer so weit vorgetriebenen Analyse schwebte ihm die Auffindung von Gesetzmäßigkeiten vor Augen, die dereinst einmal in einer „allgemeinen Pharmakologie" hätten zusammengefaßt werden können. Um auf solchem Neuland Erfolg zu haben, bedurfte es einerseits der größten Schärfe und Präzision in Fragestellung,

Denken und Beobachtung und andererseits der größten Exaktheit im methodischen Vorgehen. Über all das hat LIPSCHITZ verfügt.

Es ist verständlich, daß er glaubte, den gewünschten Einblick in die Zellfunktionen am ehesten mit Hilfe der Stoffe erhalten zu können, die am leichtesten chemisch analysierbar sind. So ist es kein Zufall, daß LIPSCHITZ einerseits das Verhalten der Alkalien und Erdalkalien und andererseits das Verhalten der Halogene in den verschiedensten Körperflüssigkeiten und in den Ausscheidungen des Organismus systematisch untersuchte. Sein Blick wandte sich also von neuem gerade den Stoffen zu, die der Begründer der experimentellen Pharmakologie, RUDOLF BUCHHEIM, ebenfalls in den Mittelpunkt seiner Untersuchungen stellte. Nur die Betrachtungsweise ist eine andere. Während BUCHHEIM die beobachteten Erscheinungen im wesentlichen unter chemischen Gesichtspunkten zu deuten sucht, stößt LIPSCHITZ immer wieder auf die überragende Bedeutung der physikalischen Chemie für die Betrachtung der Vorgänge im Organismus, auf die „Membraneigenschaften" der verschiedensten Gewebe. Auch seine zahlreichen Arbeiten über die Beeinflussung der Entzündungsreaktion und Beeinflussung der Wasserbewegungen hängen mit dem Studium der Alkali- und Erdalkali-Halogenide zusammen.

Ein anderer Weg, um Einblick in den Mechanismus der Zellfunktion zu gewinnen, bestand darin, die Änderung der Stoffe zu studieren, die sie im Kontakt mit der lebenden Substanz erfahren. Auch hier ist es wieder charakteristisch für die Arbeitsweise von LIPSCHITZ, daß er nicht wie die Untersucher früherer Zeiten die Ausscheidungsprodukte im Harn erforschte, sondern die Umwandlungsprodukte, die im Kontakt mit Gewebsschnitten, Einzelzellen oder gar Zellstrukturelementen entstehen, zu erfassen suchte. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die Untersuchungen über die biologische Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt, die ihn bis zuletzt beschäftigt haben. Unter diesem Gesichtspunkt entstanden ferner seine Studien über den Wirkungsmechanismus von Blutgiften, sowie seine Arbeiten über die Umwandlungsprodukte des ungespaltenen Blutfarbstoffs. Hierher gehören auch die schönen Untersuchungen über das Wesen der Glukuronsäurepaarung in der Leber. LIPSCHITZ hat gezeigt, daß weder die Ansicht von SCHMIEDEBERG und H. H. MEYER, wonach das Pharmakon sich mit der fertig gebildeten Glukuronsäure koppeln sollte, noch die Ansicht von E. FISCHER und PILOTY, wonach in erster Reaktionsstufe das Pharmakon sich mit der Glukose zu einem Glukosid koppeln und dann das entstandene Glukosid in zweiter Stufe zur gepaarten Glukuronsäure oxydiert werden sollte, zu Recht besteht. Vielmehr vollzieht sich die Paarung des Pharmakons zunächst azetalartig an ein Triosemolekül, wodurch ein Koppelungsprodukt entsteht, das schließlich in einer mit

der Kohlehydratsynthese konkurierenden Aufbaureaktion zur gepaarten Glukuronsäure wird.

Ein dritter Weg, um Einblick in das Wesen der Pharmakonwirkung zu bekommen, schien ihm in dem Studium der Temperaturabhängigkeit pharmakologischer Reaktionen gegeben. Auch diese Arbeitsrichtung wurzelt in seiner chemischen bzw. physiko-chemischen Denkweise. Genau wie das Studium chemischer Reaktionen unter verschiedenen Temperaturbedingungen zur Auffindung der bekannten thermodynamisch formulierbaren Gesetzmäßigkeiten geführt hatte, so konnte man hoffen, daß ein unter ähnlichen Bedingungen durchgeführtes Studium pharmakologischer Reaktionen ähnlich wertvolle Aufschlüsse ergeben könnte.

Daß ein Mann von solcher Geistesrichtung, der noch dazu von glühendem Forschungseifer erfüllt war, seinen Lebensinhalt nicht in der Betätigung auf dem Gebiete der angewandten, sondern nur auf dem Boden der voraussetzungslosen unabhängigen Wissenschaft suchen konnte, ist selbstverständlich. Diesen Boden fand er in den Jahren seiner Frankfurter Tätigkeit. Daher waren auch diese Jahre wohl die glücklichsten und fruchtbarsten in seinem Leben. Demgegenüber waren die Jahre in Istanbul bereits mit starken Hemmnissen und Einschränkungen in der Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit verknüpft. Noch schwieriger mußte für Lipschitz die seelische Situation werden, als er schließlich in der letzten Periode seines Lebens vom Schicksal gezwungen wurde, die Tätigkeit eines Pharmakologen in der Industrie zu übernehmen. Da ihm aber der Sinn für die Probleme der angewandten Pharmakologie nicht völlig fehlte, gelang ihm schließlich auch in dieser Periode neben der Schaffung einer Gruppe von Hyperaciditätsmitteln die Auffindung einer eigenartigen und hochwirksamen Klasse von Diuretica, deren Hauptvertreter das Melamin und Formoguanidin sind.

Zur Lehrtätigkeit nahm Lipschitz die Stellung ein, die der Hochschullehrer, bei dem das Schwergewicht auf der Seite der Forschung liegt, einnehmen sollte: Die Übermittlung des durch die ältere und jüngere Forschung Gesicherten an die nachfolgende Generation. Die Übermittlung der Fachkenntnisse in schulmäßiger Weise lag ihm ferne, ja er verabscheute sie beinahe. So hat er auch in Istanbul den Unterricht in der Biochemie nicht etwa als systematische Chemie der biologisch wichtigen Substanzen, sondern in Form der Erörterung der physiologisch-chemischen Probleme gegeben. Es war für ihn, der die deutsche Sprache sowohl in der Schrift als auch in der Vorlesung meisterhaft zu gestalten und zu handhaben wußte, schwer, sich auf die Bedürfnisse der anderssprechenden Länder umzustellen. In der Türkei mußte er sich vorwiegend der französischen Sprache bedienen, da die türkische, die zudem in jener Zeit im Stadium einer Umbildung begriffen war, nur

sehr schwer erlernbar ist. So war auch diese Seite seiner Tätigkeit nach seinem Weggang aus Deutschland für ihn eine Quelle der Bitterkeit.

Homo.

LIPSCHITZ als Mensch ist nicht losgelöst zu denken von LIPSCHITZ als Wissenschaftler. Trotzdem war LIPSCHITZ nicht gefangen in den Grenzen der Wissenschaft. Die Regsamkeit seines Geistes ließ ihn an allem großen Geschehen seiner Zeit Anteil nehmen. Sein Streben nach lichtdurchfluteter Klarheit machte ihn aufnahmefähig für alle ideellen Werte. Aus seiner Liebe zur Kunst schöpfte er Kraft für sein eigenes Schaffen. Wie oft habe ich gelegentlich eines Besuchs bei ihm in seiner Wohnung seine Geige in dem offenen Kasten auf dem Flügel stehen sehen, wie wenn er sie eben aus der Hand gelegt hätte. Seit 1933 freilich hat er die Geige kaum mehr angerührt und fast nur mehr als Aufnehmender aus dem reichen Kunstleben der Welthauptstadt New York gelebt. Wer die Aktivität der Persönlichkeit von LIPSCHITZ gekannt hat, bei dem das Wirken Lebenselement war, kann aus dieser Tatsache entnehmen, wie tief ihn die Verbannung aus Deutschland getroffen hat.

LIPSCHITZ war eine äußerst sensible Persönlichkeit, vergleichbar einem elektrischen Meßinstrument, das auf die kleinsten Stromstöße mit starkem Ausschlag reagiert. Er konnte zwar in den Mußestunden der lustigste und unterhaltendste Gesellschafter sein. Aber der scharf Beobachtende sah doch immer hinter aller Geselligkeitsfreude und gesellschaftlichen Gewandtheit den im Grunde dem Kompromiß abgeneigten und zu rückhaltloser Schärfe in Wort und Tat neigenden Charakter. Auch im Leben zielte er immer auf die Erkenntnis der Wahrheit. Über diesem Bestreben konnte er alle übrigen Belange und Notwendigkeiten des menschlichen Daseins vergessen. — Gelegentlich einer wissenschaftlichen Expedition ins Schweizer Hochgebirge, zu der eine große Kiste mit weißen Kaninchen zusammen mit den nötigen Apparaturen in 2500 m Berghöhe gebracht wurde, ereignete sich folgendes: An der Expedition nahmen außer LIPSCHITZ und dem Institutsgehilfen noch ein Assistent und dessen Frau teil. Die Unterkunft war etwas primitiv und zudem fügte es das Schicksal, daß es in jenen Augusttagen fast unerträglich kalt wurde und schneite. Die unglückliche weibliche Teilnehmerin der Expedition erklärte schließlich nach 2 Tagen, sie sei außerstande, sich hier oben weiter aufhalten zu können. Sie mußte in das 500 m tiefer liegende geschützte Tal gebracht werden. Die Arbeit war gestört, LIPSCHITZ begreiflicherweise etwas ärgerlich und nervös, und das Stimmungsbarometer sank tief. Am nächsten Morgen sagte LIPSCHITZ zu seinem Assistenten, als dieser zur Berghütte heraufkam: „Wissen sie, was heute Nacht passiert ist? Es sind uns drei weiße Kaninchen gestorben. Ist das nicht schrecklich? Aber jetzt verstehe ich,

warum es ihre Frau hier oben nicht aushalten konnte.“ Und als einige Tage später bei strahlendem Sonnenschein Frau X zur Berghöhe heraufgestiegen kam, begrüßte Lipschitz sie freundlich und erzählte ihr dasselbe mit denselben Worten.

Er hat bei vielen Menschen, mit denen er zu tun hatte, den Eindruck eines hochmütigen, anmaßenden und herzlosen Mannes hervorgerufen. Das hat ihm häufig genug Feinde gemacht. Wer ihn aber genau gekannt hat, wußte, daß er dieselbe Kritik und dieselbe strenge Forderung, die er an seine Mitmenschen stellte, auch gegen sich selbst angewandt hat. Er hat oft genug mit sich gerungen, um die Dinge so klar zu sehen, daß er ihnen volle Gerechtigkeit widerfahren lassen konnte, und er hat sich oft selbst so scharf kritisiert, daß das Urteil, zu dem er über sich kam, ihn schutzlos seiner Umgebung auslieferte. — Als Lipschitz von Istanbul schied, war seine Frau mit den Kindern schon in die Schweiz gefahren, und er mußte zur Erfüllung seines Kontraktes im September noch einmal nach Istanbul. Als er von dort in die Schweiz zurückkam, erzählte er seiner Frau verwundert und gerührt: „Es waren mindestens 20 Leute an der Bahn, um mir Lebewohl zu sagen. Ich verstehe das gar nicht, wo du doch schon weg warst.“

Die außergewöhnlich scharfe Kritik und die Strenge, die Lipschitz den Menschen und den Dingen entgegenbrachte, hatten aber dennoch ihre Grenzen an seiner im Innern zum Wohlwollen neigenden Grundeinstellung und seiner Befähigung zu warmem freundschaftlichem Verhalten. Stand für ihn erst einmal Charakter und bona fides eines Menschen fest, so hielt sein Vertrauen auch stand und blieb unerschüttert selbst durch Weltereignisse. Zu seinen Untergebenen hatte er, wenn er von deren Lauterkeit überzeugt war, das beste Verhältnis. Das galt vor 1933 ebenso wie später. Er verhielt sich zu ihnen als Mensch zu Mensch, unbekümmert um Standes- und äußere Rangunterschiede.

Lipschitz hat die Tatsache, daß schließlich die Zerstörung Deutschlands und damit die Zerstörung des Mutterbodens für sein eigenes kulturelles Fühlen und Schaffen unausweichliche Wirklichkeit wurde, mit tiefem Schmerz empfunden, ja dieser Schmerz übertraf noch den Schmerz über die eigene Vertreibung.

Finis.

Das Schicksal hat Lipschitz ringend um die Erfüllung seiner Lebensaufgabe aus dem Leben gerissen. Viele seiner weitgespannten Pläne sind unerfüllt geblieben. Die Arbeiten auf den verschiedenen teils von ihm selbst betriebenen, teils von ihm angeregten Forschungsrichtungen sind früher oder später zum plötzlichen Stillstand gekommen, überrascht von den Auswirkungen der großen Katastrophe des Abendlandes. Diese Katastrophe hat sein pulsierendes wissenschaftliches Leben

erstickt, fast wie seinerzeit der ausbrechende Vesuv das Leben in Pompeji. Die Forschungsstätte in Frankfurt a. M., die der Boden für die fruchtbarste Zeitepoche im Leben von LIPSCHITZ gewesen ist, ist unter der Einwirkung von Brand- und Sprengbomben fast zur Ruine geworden; ein Zustand, aus dem sie sich auch heute noch kaum erholt hat.

Über dem Leben von WERNER LIPSCHITZ liegt eine Tragik. Wie jeder Mensch mußte LIPSCHITZ leben nach dem Gesetz, nach dem er angetreten. Dieses Gesetz hieß in seinem Fall, ein Forscher auf dem Gebiet der reinen Wissenschaft ohne jedes Kompromiß und in aller Geschlossenheit zu sein. Und dafür hat die Zeit, in der er lebte, schon keinen Raum mehr geboten[1].

Frankfurt a. M., den 22. März 1949. WALTHER LAUBENDER.

Arbeiten von W. Lipschitz.

I. Originalarbeiten.

1. MICHAELIS, L., (u. W. LIPSCHITZ): Die Säuredissoziationskonstanten der Alkohole und Zucker, insbesondere der Methylglucoside. Ber. dtsch. chem. Ges. **46**, 3683 (1913).
2. LIPSCHITZ, W.: Optisch aktive N-Monomethylderivate von Alanin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin. Inaug.-Diss. Berlin 1915.
3. FISCHER, E., u. W. LIPSCHITZ: Optisch aktive N-Monomethylderivate von Alanin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin. Chem. Zbl. **1**, 985 (1915).
4. LIPSCHITZ, W.: Ein Beitrag zur Kenntnis des Diabetes insipidus. Diss. Leipzig 1916.
5. FISCHER, E., M. BERGMANN u. W. LIPSCHITZ: Neue Synthese der Digallussäure und Wanderung von Acyl bei der teilweisen Verseifung acylierter Phenol-Carbonsäuren. Chem. Zbl. **1**, 522 (1918).
6. LIPSCHITZ, W.: Einige Fehlerquellen bei Untersuchungen von Nieren- und Stoffwechselkranken. Z. klin. Med. **86**, 375 (1918/19).
7. LIPSCHITZ, W.: Zur Frage der Permeabilität des Lungenepithels für Ammoniak. Pflügers Arch. **176**, 1 (1919).
8. LIPSCHITZ, W.: Die osmotischen Veränderungen des Blutes nach Infusion hypertonischer Traubenzuckerlösung. Arch. exper. Path. (D.) **85**, 359 (1920).
9. LIPSCHITZ, W.: Mechanismus der Giftwirkung aromatischer Nitroverbindungen, zugleich ein Beitrag zum Atmungsproblem tierischer und pflanzlicher Zellen. Habilitationsschrift. Hoppe-Seylers Z. **109**, 189 (1920).
10. HERTWIG, G., u. W. LIPSCHITZ: Mechanismus der Giftwirkung aromatischer Nitroverbindungen. II. Mitt.: Beeinflussung der Lebensfunktionen isolierter Zellen. Pflügers Arch. **183**, 275 (1920).
11. LIPSCHITZ, W.: Der Zusammenhang von Zellatmung und Giftwirkungen. Med. Klin. **1920**, 1260.
12. ELLINGER, A., u. W. LIPSCHITZ: Die Behandlung der Phosgenvergiftung mit der Einspritzung hypertonischer Traubenzuckerlösung. Z. exper. Med. **13**, 234 (1921).

[1] Bei der Abfassung dieser Zeilen bin ich durch Mitteilungen und Materialübersendung von Frau DORA LIPSCHITZ geb. EDINGER und von den Herren H. BRAUN (Istanbul), S. LOEWE (Salt Lake City), O. RIESSER (Frankfurt a. M.) und H. WINTERSTEIN (Istanbul) in freundlicher Weise unterstützt worden.

13. Lipschitz, W., u. A. Gottschalk: Die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe als Indicator von Teilvorgängen der Atmung und der Gärung. I. Mitt. Versuche an atmenden Zellen. Pflügers Arch. **191**, 1 (1921).
14. Lipschitz, W., u. A. Gottschalk: Die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe als Indicator von Teilvorgängen der Atmung und der Gärung. II. Mitt.: Versuche an gärenden Zellen. Pflügers Arch. **191**, 33 (1921).
15. Lipschitz, W., u. G. Hertwig: Erhaltung der Funktionen aerober Zellen bei Ersatz des freien Sauerstoffs durch chemisch gebundenen „Pseudoanoxybiose". III. Mitt.: Versuche an Spermatozoen. Pflügers Arch. **191**, 51 (1921).
16. Lipschitz, W.: Forschungsprobleme und Ergebnisse auf dem Gebiet der Zellatmung und der biologischen Oxydationen. Klin. Wschr. **1922**, 33.
17. Lipschitz, W.: Die Wirkung von Giften auf die energieliefernden Zellprozesse. Verh. dtsch. pharmak. Ges. Nr 1. 2. Tagg 29. Sept. bis 1. Okt. 1921 Freiburg i. Br. Arch. exper. Path. (D.) **92**, XXVI (1922).
18. Lipschitz, W.: Über den Mechanismus der Zelloxydationen und der Blausäurewirkung. Pflügers Arch. **196**, 181 (1922).
19. Lipschitz, W.: Die Wirkung von Hormonen auf die Zelloxydationen und den Wärmehaushalt des Organismus. Verh. 34. Kongr. dtsch. Ges. inn. Med., S. 409. Wiesbaden 1922. (Nach Versuchen gemeinsam mit Prof. L. Adler.)
20. Adler, L. u. W. Lipschitz: Die Wirkung von Hormonen auf die Zelloxydationen und den Wärmehaushalt des Organismus. Arch. exper. Path. (D.) **95**, 181 (1922).
21. Lipschitz, W.: Die Wirkung von Tyramin auf die Tauben-Beriberi. Hoppe-Seylers Z. **124**, 194 (1923).
22. Lipschitz, W.: Bemerkungen zu der Abhandlung von Prof. H. Winterstein. „Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung von Wasserstoffacceptoren". Pflügers Arch. **198**, 648 (1923).
23. Lipschitz, W.: Über Nitroreduktionen durch lebende Gewebe. Bemerkung zu der gleichnamigen Veröffentlichung von N. Watermann u. J. Kalff. Biochem. Z. **138**, 274 (1923).
24. Lipschitz, W.: Die Bedeutung der Gewebsatmung für klinische Fragestellungen. Dtsch. med. Wschr. **1923**, Nr 24, 778.
25. Lipschitz, W.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus und seine Bedeutung für den Stoffwechsel. 53. Bericht d. Senckenbergischen Naturforschenden Ges. Frankfurt a. M. **1923**, H. 1, 1.
26. Lipschitz, W., u. H. Freund: Eine neue Methode zur vergleichenden Prüfung der Wirkung von Desinfizientien auf Bakterien und Körperzellen. Med.-Biol. Abend der Universität Frankfurt a. M. am 11. Juli 1922. Klin. Wschr. **1923**, Nr 7, 325.
27. Lipschitz, W., u. H. Freund: Die Beziehung der bakteriziden Wirkungsstärke von Chinin und Hydrocupreinhomologen zu ihrer Atmungshemmung gegenüber Bakterien und Körperzellen. Arch. exper. Path. (D.) **99**, 226 (1923).
28. Lipschitz, W.: Untersuchungen über die therapeutische Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln durch Messung der Zellatmung. Zbl. Bakter. usw. **90**, 569 (1923).
29. Lipschitz, W.: Untersuchungen über die therapeutische Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln. Klin. Wschr. **1923**, Nr 36, 1689.
30. Lipschitz, W.: Die Wirkung von Chininderivaten auf Gaswechsel und Stoffwechsel. Tagg dtsch. physiol. Ges. Tübingen 4.—7. Sept. 1923. Ber. Physiol. usw. **22**, 497 (1924).

31. LIPSCHITZ, W.: Über den Wirkungsmechanismus von Blutgiften. Med.-Biol. Abend Frankfurt a. M., Sitzung am 14. Jan. 1924. Klin. Wschr. **1924**, Nr 14, 602.
32. LIPSCHITZ, W., u. J. WEBER: Über Methämolgobinbildung. Hoppe-Seylers Z. **132**, 251 (1924).
33a. LIPSCHITZ, W., u. J. OSTERROTH: Über die biologische Reduktion aromatischer Nitroverbindungen. Pflügers Arch. **205**, 354 (1924).
33b. LIPSCHITZ, W., u. P. MEYER: Über die anaerobe Kohlensäureproduktion von Muskelzellen bei Gegenwart von Wasserstoffacceptoren. Pflügers Arch. **205**, 366 (1924).
34. LIPSCHITZ, W., u. J. OSTERROTH: Über Kombinationswirkungen des Camphers. Arch. exper. Path. (D.) **106**, 341 (1925).
35. LIPSCHITZ, W.: Katalyse von Oxydoreduktionen durch die Blutfarbstoffe. Vortrag in der physiol.-pharmakol. Sektion auf der 88. Verslg dtsch. Naturforscher und Ärzte, Innsbruck Sept. 1924.
36. LIPSCHITZ, W.: Katalyse von Oxydoreduktionen durch die Blutfarbstoffe. Hoppe-Seylers Z. **146**, 1 (1925).
37. LIPSCHITZ, W.: Bioskopische Reduktionsmethoden. Bemerkungen zu den gleichnamigen Mitteilungen von O. KIRCHNER. Arch. Hyg. (D.) **97**, 94 (1926).
38. ROSENTHAL, B., u. W. LIPSCHITZ: Versuche zur Pharmakologie des Eiweißstoffwechsels und des Wärmehaushaltes. Med.-Biol. Abend der Med. Fakultät Frankfurt a. M., Sitzung vom 14. Dez. 1925. Klin. Wschr. **1926**, Nr 14, 627.
39. ROSENTHAL, B. u. W. LIPSCHITZ: Die Wirkung von Chinin und Chininderivaten auf Stoffwechsel und Wärmehaushalt. Arch. exper. Path. (D.) **116**, 39 (1926).
40. ROSENTHAL, B., u. W. LIPSCHITZ: Berichtigung zur vorstehenden Arbeit. Arch. exper. Path. (D.) **117**, 380 (1926).
41. LIPSCHITZ, W.: Magen und Niere als Ausscheidungskonkurrenten. Klin. Wschr. **1926**, Nr. 43, 2008.
42. LIPSCHITZ, W.: Die Veränderung der Erdrinde durch Verwitterung. Natur u. Museum **57**, 44 (1927).
43. LIPSCHITZ, W.: Die aromatischen Nitro- und Aminokörper als Blutgifte. Zbl. Gewerbehyg. **4**, H. 1 (1927).
44. LIPSCHITZ, W., u. J. OSTERROTH: Die pharmakologischen Wirkungen eines Antipyrinderivates, des Antipyriliminopyrin. Z. exper. Med. **56**, 433 (1927).
45. LIPSCHITZ, W., u. R. SALOMON: Über den Wirkungsmechanismus campherartiger Substanzen. Verh. dtsch. pharmak. Ges., 7. Tagg, Würzburg 1927. Arch. exper. Path. (D.) **128**, 125 (1928).
46. LIPSCHITZ, W.: Weitere Untersuchungen zur bioskopischen Reduktionsmethode usw., Bemerkungen zu der gleichnamigen Mitteilung von O. KIRCHNER. Z. Immunit.forsch. **56**, 375 (1928).
47. LIPSCHITZ, W.: Im Blut kreisende Substanzen als Grundlage für Lichtdermatosen. Strahlenther. **29**, 9 (1928).
48. LIPSCHITZ, W.: Narkotica, Schlafmittel und die Modeströmungen ihrer Anwendung. Sitzg des ärztl. Ver. Frankfurt a. M. v. 6. Febr. 1928. Klin. Wschr. **1928**, Nr 19, 913.
49. LIPSCHITZ, W.: Narkotica, Schlafmittel und die Modeströmungen ihrer Anwendung. Schmerz **2**, 566 (1928).
50. LIPSCHITZ, W.: Colorimetrische Messung der Zelloxydationen durch Reduktion von Nitrokörpern und Nitraten. OPPENHEIMER-PINCUSSEN, Die Fermente, Bd. 3. 1928.

51. Lipschitz, W., u. R. Weingarten: Über die Wirkungssteigerung von Lokalanästhetica durch bahnende Substanzen. I. Mitt. Arch. exper. Path. (D.) **137**, 1 (1928).
52. Laubender, W., W. Lipschitz u. R. Weingarten: Ein neues Prinzip der Wirkungssteigerung von lokalanästhetischen Mitteln. Verh. dtsch. pharmak. Ges., 8. Tagg, Hamburg 1928. Arch. exper. Path. (D.) **138**, 153 (1928).
53. Lipschitz, W.: Entzündungshemmung durch Hypnotika. Verh. dtsch. pharmak. Ges., 8. Tagg, Hamburg 1928. Arch. exper. Path. (D.) **138**, 163 (1928).
54. Lipschitz, W.: Über die Membranfunktion des Magens. 10. Tagg dtsch. physiol. Ges. in Frankfurt a. M. vom 27.—30. Sept. 1927. Ber. Physiol. usw. **42**, 573 (1928).
55. Lipschitz, W.: Prinzipien der Kombination von Schlafmitteln. Arch. Psychiatr. (D.) **86**, H. 2 (1928).
56. Lipschitz, W.: Die Bedeutung des „inneren Kreislaufes" für Krystalloide, speziell des Jodions. Klin. Wschr. **1929**, Nr 3, 116.
57. Lipschitz, W. u. W. Laubender: Die pharmakologischen Wirkungen des Percain, eines neuen Lokalanaestheticums. Klin. Wschr. **1929**, Nr 31, 1438.
58. Lipschitz, W.: Das Schicksal der Halogene an den Membranen des tierischen Organismus. Verh. dtsch. pharmak. Ges. 9. Tagg, Münster 1929. Arch. exper. Path. (D.) **147**, 68 (1930).
59. Lipschitz, W.: Der Durchtritt der Halogene durch die Membranen des tierischen Organismus. Arch. exper. Path. (D.) **147**, 142 (1930).
60. Brand, Ph., u. W. Lipschitz: Über die Abhängigkeit der Giftwirkung von Reaktionstemperatur. Versuche am überlebenden Dünndarm. Arch. exper. Path. (D.) **147**, 105 (1930).
61. Lipschitz, W., P. Meyer u. R. Salomon: Die Grundwirkungen des Camphers und campherartiger Substanzen. Arch. exper. Path. (D.) **148**, 257 (1930).
62. Lipschitz, W.: Differenzierung des Thyroxinjods vom anorganischen Jod durch die Membranen des lebenden Organismus. Klin. Wschr. **1930**, Nr 14, 642.
63. Lipschitz, W., u. W. Laubender: Die pharmakologischen Wirkungen des Percains. II. Mitt.: Toxikologische Untersuchungen. Klin. Wschr. **1930**, Nr 21, 968.
64. Lipschitz, W., D. Peng, K. Guggenheim, H. Winkler u. H. Fröhlich: Studien zur Pharmakologie der Entzündung. I.—V. Mitt. Arch. exper. Path. (D.) **151**, 267 (1930).
65. Laubender, W., u. W. Lipschitz: Studien zur Pharmakologie der Entzündung. VI. Mitt.: Die Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch Höhenklima. Arch. exper. Path. (D.) **158**, 163 (1930).
66. Girndt, O., u. W. Lipschitz: Über die Wirkung des Morphins auf die Körpertemperatur. Versuche an normalen Kaninchen. Arch. exper. Path. (D.) **159**, 249 (1931).
67. Lipschitz, W., u. O. Girndt: Wertbestimmung von Schilddrüsenpräparaten des Handels. Arch. exper. Path. (D.) **159**, 259 (1931).
68. Lipschitz, W.: Über das Verhalten der Halogene im Organismus. Klin. Wschr. **1931**, Nr 49, 2241.
69. Lipschitz, W., u. W. Hsing: Die Abhängigkeit der Wirkung uteruserregender Mittel (Oxytocin und Barium) von Konzentration und Reaktionstemperatur. I. Mitt.: Über die Prinzipien pharmakologischer Wirkung. Pflügers Arch. **229**, 672 (1932).
70. Lipschitz, W.: Über die Reaktion zwischen Organ und Pharmakon. Med.-Biol. Abend der Med. Fakultät in Frankfurt a. M., Sitzung vom 25. Jan. 1932. Klin. Wschr. **1932**, Nr 27, 1165.

71. Lipschitz, W.: Über die Toxizität des Chlorats. Arch. exper. Path. (D.) **164**, 570 (1932).
72. Lipschitz, W., u. F. Schmitt: Studien zur Pharmakologie der Entzündung. VII. Mitt. Arch. exper. Path. (D.) **164**, 641 (1932).
73. Lipschitz, W., u. W. Laubender: Percain-Toxikologie. Bemerkungen zu den Ausführungen von Ph. Ellinger, H. Führer und B. Wilkmann. Slg Vergiftfälle **3**, 217 (1932).
74. Lipschitz, W., u. E. Reuter: Studien zur Pharmakologie der Entzündung. IX. Mitt.: Die Wirkung wasser- und salzmobilisierender Mittel auf die Entzündungsreaktion. Arch. exper. Path. (D.) **171**, 650 (1933).
75. Lipschitz, W., u. F. Klar: Die Abhängigkeit der Wirkung uteruserregender Mittel (Histamin und Ergotamin) von Konzentration und Reaktionstemperatur. Arch. exper. Path. (D.) **174**, 223 (1934).
76. Lipschitz, W.: Transmineralisation des Organismus und ihre Bedeutung für Entzündungsvorgänge. Schweiz. med. Wschr. **1935**, Nr 19, 425.
77. Lipschitz, W.: Mikromethode zur Bestimmung von Halogen in Körperflüssigkeiten und Geweben. Arch. internat. Pharmacodynamie **49**, 379 (1935).
78. Lipschitz, W.: Das Schicksal von injiziertem Kochsalz und Calciumchlorid im Organismus. Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges. Eindsiedeln, 116. Jahresverslg S. 385. 1935.
79. Lipschitz, W.: Das Schicksal von intravenös gegebenem Kochsalz und Calciumchlorid im Kaninchenorganismus und ihre Wirkungen auf die Gewebe. Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 200 (1936).
80. Lipschitz, W.: Sur la régulation sympathique de la glycémie et du métabolisme des Chlorures tissulaires. Compt. rend. des séances de la société de biologie **121**, 1295 (1936). Séance du 28. III. 1936.
81. Lipschitz, W.: Mobilisierung des Salzdepots im Organismus durch Arterienunterbindung. Wirkung des Adrenalins auf den Mineralhaushalt. Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 215 (1936).
82. Lipschitz, W.: Über experimentelle Verschiebungen im Mineralhaushalt des Kaninchens und ihre Beziehungen zur Entzündungsreaktion. Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 187 (1936).
83. Lipschitz, W., et E. Büding: Sur les d-et l-bornéolglucosides. Compt. rend. des séances de l'académie des sciences **205**, 58. Séance du 5. II. 1937.
84. Lipschitz, W.: Das Verhalten von Halogeniden und Nitrat an Drüsenmembranen: 1. Wertheimersches Froschpräparat, 2. Parotisdrüse und Niere des Hundes. Arch. ital. Sci. farmacol. **15** (1937). Festschrift für Benedicenti.
85. Lipschitz, W., u. E. Büding: Bildungsmechanismus gepaarter Glucuronsäuren. Kongreßbericht II des XVI. internationalen Physiologenkongresses, Zürich (Schweiz) 1938.
86. Lipschitz, W.: The fundamental effects of the camphor group. Amer. J. med. Sci. **197**, 434 (1939).
87. Lipschitz, W.: Mechanism of the acidification of blood by calcium salts. J. Pharmacol. (Am.) **66**, 22 (1939).
88. Lipschitz, W.: Mechanism of the acidification of blood by calcium salts. Proc. amer. Soc. Pharmacol. S. 22, 30th meeting Toronto, 1939.
89. Lipschitz, W. and E. Büding: Mechanism of the biological formation of conjugated glucuronic acids. J. biol. Chem. (Am.) **129**, 333 (1939).
90. Lipschitz, W., and Z. Hadidian: Bioassay of diuretics. Federation Proceedings **1**, No 1 (1942).
91. Lipschitz, W., Upham, Hotchkiss and Carlson: The parenteral use of organic esters. J. Pharmacol. (Am.) **76**, 189 (1942).

92. Lipschitz, W.: The dependency of the anion on the associated cation in the distribution and excretion of halides in the body. Exper. Med. a. Surgery **1**, 171 (1943).
93. Lipschitz, W., Z. Hadidian and A. Kerpczar: Bioassay of diuretics. J. Pharmacol. (Am.) **79**, 97 (1943).
94. Lipschitz, W., and Z. Hadidian: Amides, amines and related compounds as diuretics. J. Pharmacol. (Am.) **81**, 84 (1944).
95. Lipschitz, W.: Diuresis and diuretics. Proc. Rudolf Virchow Medical Soc. New York 1944.
96. Lipschitz, W.: The action of ammonia and allophanic azide. J. Amer. chem. Soc. **66**, (4), 658 (1944).
97. Lipschitz, W.: Antiacid compositions. U. S. Pat. 2.363.386, 1944.
98. Lipschitz, W., and E. Stokey: The mode of action of three new diuretics: Melamine, Adenine and Formoguanamine. J. Pharm. (Am.) **83**, 235 (1945).
99. Lipschitz, W.: A new group of diuretics. Bull. New England Med. Center **7**, 78 (1945).
100. Lipschitz, W.: Giftungen und Entgiftungen im Tierkörper. Schweiz. med. Wschr. **1946**, Nr 22, 486.
101. Lipschitz, W., and E. Stokey: Mechanisms of antidiuresis in the dog and in the rat. Amer. J. Physiol. **148**, 259 (1947).
102. Lipschitz, W.: Regulation of the kidney functions in various species of animals. 17. internat. Physiol. Kongreß, S. 89. 1947.
103. Lipschitz, W., and E. Stokey: Diuretic action of Formoguanamine in normal persons. J. Pharmacol. (Am.) **92**, 131 (1948).
104. Lipschitz, W.: Giftung und Entgiftung aromatischer Nitroverbindungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **205**, 305 (1948).

II. Handbuchartikel, Sammelwerke usw.

105. Lipschitz, W.: Über den Wirkungsmechanismus von Blutgiften. Ergebnisse der Physiologie, Bd. 23, Abt. 1, S. 1. 1924.
106. Lipschitz, W.: Indicatormethoden zum Nachweis von Zelloxydationen. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 1. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1925 (1936).
107. Lipschitz, W.: Spezielle Biochemie der Zelle. VIII. Allgemeiner Zellstoffwechsel. B. Über energieliefernde Zellprozesse. C. Oppenheimers Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, Bd. II. Jena: Gustav Fischer 1925.
108. Lipschitz, W.: Übersicht über die chemischen Systeme des Organismus und ihre Fähigkeit Energie zu liefern. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 1, S. 26. Berlin: Springer 1927.
109. Lipschitz, W.: Umwandlungsprodukte des ungespaltenen Blutfarbstoffes. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 6, Teil 1, S. 149. Berlin: Springer 1928.
110. Lipschitz, W.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 10. Tagg, gehalten vom 4. bis 7. Sept. 1930 in Königsberg i. Pr. Arch. exper. Path. (D.) **157**, H. 1 (1930).
111. Lipschitz, W.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 11. Tagg, gehalten vom 8. bis 11. April 1932 in Wiesbaden. Arch. exper. Path. **167**, H. 1 (1932).

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 256—293 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. Westf.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser)
und dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung Heidelberg,
Institut für Chemie (Direktor: Prof. Dr. Richard Kuhn).

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Thiouracilen und Amino-thiouracilen auf Stoffwechsel und Organe*.

Von

Rudolf Kopf, Arnold Loeser, Gerda Meyer,

gemeinsam mit

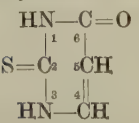
Hans-Joachim Bielig.

Mit 7 Textabbildungen.

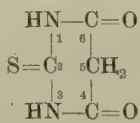
(Eingegangen am 19. September 1948.)

I. Einleitung und Problemstellung.

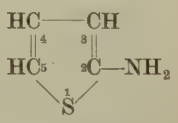
Mackenzie und Mitarbeiter[1, 2] beobachteten 1941/42, daß Sulfonamide und Thioharnstoffe die Schilddrüse von Ratten, Mäusen und Hunden vergrößern und stellten fest, daß Sulfaguanidin den Stoffwechsel der Versuchstiere senkt. Unabhängig von diesen Autoren fanden Astwood und Mitarbeiter[3, 4, 5], daß vor allem organische Schwefelverbindungen, welche die Gruppierung —C(=S)—NH oder deren tautomere Form aufweisen, bei oraler Verabreichung *antithyreoidal* wirksam sind, d. h. die Schilddrüsentätigkeit und/oder die Wirkungen des Schilddrüsenhormons beeinträchtigen. Solche, seit 1943 an weiteren wissenschaftlichen und industriellen Forschungsstellen mit ähnlicher Methodik *experimentell* geprüften Stoffe, sind das 2-Thiouracil und zahlreiche seiner in 4- bzw. 5-Stellung mono- oder dialkylierten Derivate, Abkömmlinge der 2- und 4-Thiobarbitursäure, ferner das 2-Aminothiazol, das 2-Mercaptoimidazol, das 2-Mercaptothiazolin, das Pseudothiohydantoin und viele andere[6, 7, 8].



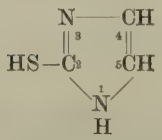
2-Thiouracil



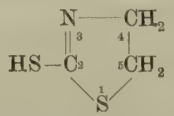
2-Thiobarbitursäure



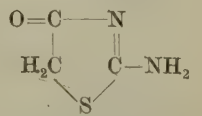
2-Aminothiazol



2-Mercaptoimidazol



2-Mercaptothiazolin



Pseudothiohydantoin

* Dem Andenken an E. Baumann, der vor wenig mehr als 50 Jahren (1895) als erster organisch gebundenes Jod in der Schilddrüse nachwies [Z. physiol. Chem. **21**, 319 (1895/96)].

Benutzt man wie die genannten amerikanischen Autoren als Gradmesser für die antithyreoidale Wirksamkeit bestimmte *reaktive* Veränderungen in der Schilddrüse — Gewichtszunahme der Drüse, Herabsetzung des Gesamtjodgehaltes, Veränderung der Struktur im Sinne einer Aktivierung und Hyperplasie - und setzt die „antithyreoidale Aktivität" des 2-Thiouracil = 1, so ergeben sich für entsprechende Dosierungen einer Auswahl geprüfter Substanzen jeder Gruppe die in Tabelle 1 verzeichneten Vergleichswerte.

Tabelle 1. *Relative „antithyreoidale Aktivität" verschiedener organischer Schwefelverbindungen bei der Ratte.*
(Ausgewählt nach Astwood[3, 5], Anderson[9], McGinty[10] und Mitarbeitern)
Thiouracil = 1.

Thioharnstoff	0,1	4-p-Chlorphenyl-2-thiouracil	0,01
Tetramethylthioharnstoff	0,3	4-Amino-2-thiouracil	0,001
4-Methyl-2-thiouracil	1	4,5-Dimethyl-2-thiouracil	1,2
5-Methyl-2-thiouracil	1	4,5-Diäthyl-2-thiouracil	2,0
4-Äthyl-2-thiouracil	8	4-Methyl-5-äthyl-2-thiouracil	0,9
5-Äthyl-2-thiouracil	3,5	4-Äthyl-5-methyl-2-thiouracil	3,5
4-Propyl-2-thiouracil	11		
5-Propyl-2-thiouracil	2	2-Thiobarbitursäure	0
4-Isopropyl-2-thiouracil	9	5,5-Diäthyl-2-barbitursäure	1,7
5-Isopropyl-2-thiouracil	2,5	2-Aminothiazol	0,1
4-Phenyl-2-thiouracil	1	2-Mercaptoimidazol	1,5
4-Benzyl-2-thiouracil	10	2-Mercaptothiazolin	1,3
		2-Mercapto-5-amino-1,3,4-thiadiazol	1,6

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die wirksamsten Verbindungen die 4-Alkylderivate des 2-Thiouracil sind. Die Wirkung steigt vom 4-Methyl- bis zum 4-n-Propylderivat an und sinkt mit steigender Zahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette wieder ab. Die 4-Iso-alkylabkömmlinge, die 5-Alkyl- und die 4,5-Dialkylderivate haben eine geringere Wirksamkeit als die unverzweigten 4-Monoalkylverbindungen des 2-Thiouracil. Die Anwesenheit einer polaren Gruppe (z. B. einer 4-Aminogruppe) im 2-Thiouracil vernichtet die „antithyreoidale Aktivität". Für die Wirkung auf die Schilddrüse ist, wie am 4-Amino-2-thiouracil und an der 2-Thiobarbitursäure ersichtlich, nicht die $-C(=S)-NH-$-Gruppierung allein verantwortlich. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß auch schwefelfreie Derivate des Anilins (z. B. p-Aminobenzoesäure) „antithyreoidal" wirken können[11].

Die mehr oder weniger großen Veränderungen, die derartige Substanzen, abhängig von ihrer Konstitution, im funktionellen Zustand und im anatomischen Bild der Schilddrüse hervorrufen, haben die Frage nach dem Angriffspunkt dieser Verbindungen und den Beziehungen aufgeworfen, die, abgesehen von zentralen Einwirkungen, zwischen Schilddrüse, Hypophysenvorderlappen, Jodverteilung und Stoffwechsel bestehen.

Bei normalem, nahrungsbedingtem Jodspiegel im Blute stellt die intakte Schilddrüse unter dem physiologischen Reiz des thyreotropen Hormones aus dem Hypophysenvorderlappen den Bedarf des Organismus an Jodthyreoglobulin sicher. Ausgehend von den Vorstellungen von Harington[12] nimmt man an, daß bei der Synthese des Schilddrüsenhormones primär Jodion fermentativ oxydiert und dann an Tyrosin zu Dijodtyrosin organisch gebunden wird. 2 Mole

Dijodtyrosin werden sekundär zum Thyroxin-globulin (Jodthyreoglobulin) vereinigt. Nach den Ergebnissen der Jodierung des Casein[13] kann das Schilddrüsenhormon auch durch direkte Jodierung von Protein entstehen.

Das histologische Bild der Schilddrüse ist bei der physiologischen Hormonsynthese beim Menschen und den verschiedenen Tierarten nicht genau dasselbe[14, 15]. Abhängig von der Rasse und der Jahreszeit zeigen beispielsweise Meerschweinchen und Kaninchen im allgemeinen eine „ruhige" Drüse, d. h. eine Drüse mit flachem Epithel und kolloidgefüllten Follikeln. Die Rattenschilddrüse weist kubisches Epithel mit mehr oder weniger kolloidfreien Follikeln auf. Die Schilddrüse des Menschen nimmt eine Mittelstellung ein, wobei in ein und derselben Drüse aktive Bezirke neben ruhigen vorkommen können. Loeser[16] und Grab[17] haben im Tierversuch (Hund) gezeigt, daß intraperitoneale Zufuhr von thyreotropem Hormon die Schilddrüse zur Abgabe des gespeicherten Jodthyreoglobulin veranlaßt und eine Neubildung des Hormones anregt. Versuche mit radioaktivem Jod als Indikator bestätigten dieses Ergebnis[18]. Verabreichung von Jodid führt nach Loeser[19] bei genügend hoher Dosierung zur verstärkten Ausschüttung von thyreotropem Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen und damit zu demselben Ergebnis wie die direkte Zufuhr des Hormones. Histologisch äußert sich diese Einwirkung auf die Schilddrüse in einer „Aktivierung" der jeweiligen normalen Ausgangsdrüse: Erhöhung und Proliferation der Drüsenzellen sowie Abnahme des Kolloids. Parallel mit der vermehrten Ausschüttung von Schilddrüsenhormon geht eine Steigerung des Stoffwechsels und eine zunehmende Ausscheidung von Jod. Entsprechende Verhältnisse liegen vermutlich den Krankheitsbildern der Hyperthyreosen (Thyreotoxikose, Morbus Basedow) zugrunde.

Verschiedene amerikanische Arbeitskreise zeigten, daß bei Ratten[20, 21], Kaninchen[22] und Kücken[23] Thiouracil und verwandte Substanzen die Ansammlung von Jod in der Schilddrüse verhindern. Diese Tatsache wird auf die Hemmung eines oxydierend wirkenden Fermentsystems zurückgeführt. Unentschieden ist unseres Wissens bisher, ob die primäre Oxydation von Jodid zu Jod, die sekundäre Umwandlung von Dijodtyrosin in Thyroxin oder beide Vorgänge beeinträchtigt werden. Dempsey[24] weist in der Schilddrüse histochemisch Peroxydase nach, die durch Thiouracil gehemmt wird. Eine Isolierung dieses Fermentes gelingt indessen nicht[25]. Nach Kuhn, Beinert und Bielig[26] reagiert Thiouracil andererseits ähnlich wie Cystein mit p-Chinon. Es könnte danach in die Überführung von Dijodtyrosin in Thyroxin eingreifen, bei der nach Harington[12] eine chinoide Zwischenstufe auftritt. In diese Richtung deutet auch die Beobachtung[27], daß die Schilddrüse von mit Thiouracil gefütterten Tieren zwar noch Jod aus größeren Mengen zugeführtem Kaliumjodid aufzunehmen, dieses indessen nicht in Thyroxin überzuführen vermag. Miller, Roblin und Astwood[28] prüften experimentell die Annahme von Campbell und Mitarbeitern[29], daß derartige Thioverbindungen direkt mit Jod reagieren. Es wurde gefunden, daß in neutralen, gepufferten Lösungen quantitativ Disulfidbildung eintritt und daß Thiouracil, wie andere Substanzen mit freien SH-Gruppen, diese Reaktion ebenso verhindert wie die Bildung von jodiertem Casein aus Casein und Jod. Aus der verminderten Wirkung von injiziertem Thyroxin in Gegenwart von 4-Methylthiouracil bei Ratten, denen die Schilddrüse exstirpiert worden war, schließt Abelin[30], daß zwischen Thyroxin und Methylthiouracil auch ein direkter Antagonismus besteht.

Der Hemmung von Jodaufnahme und Jodthyreoglobulinbildung unter der Einwirkung von 2-Thiouracil und seinen geprüften Alkylderivaten folgt bei normalen Tieren ein histologisches Bild der Schilddrüse, das mit dem übereinstimmt, welches man nach Injektion von thyreotropem Hormon beobachtet[23, 31].

Daß es sich hier tatsächlich um eine Wirkung des thyreotropen Hormones handelt, geht im Sinne der Auffassung von LOESER[19] daraus hervor, daß unter Thiouracil einerseits die Resorption von Jod durch die Schilddrüse fehlt und damit der Blutjodspiegel erhöht wird, andererseits durch fehlende Bildung, die Menge an Jodthyreoglobulin im Blute absinkt. Beide Momente veranlassen den Hypophysenvorderlappen zur Ausschüttung von thyreotropem Hormon. Dieses ist, soweit wir bisher wissen, das einzige Agens, welches die Schilddrüse anatomisch und funktionell im Sinne einer Basedow-Schilddrüse verändert. In Einklang hiermit steht, daß die Hypophyse von mit Thiouracil behandelten Tieren infolge der vermehrten Abgabe an thyreotropem Hormon verarmt[32] und der stimulierende Effekt auf die Schilddrüse nach Hypophysektomie ausbleibt[2, 33].

Eine Reihe der vorstehend aufgeführten, im Tierversuch geprüften „antithyreoidalen" Stoffe ist auch *klinisch* zur Behandlung von Hyperthyreosen herangezogen worden[34, 35, 36]. Dabei haben sich bis heute 4-Propyl-2-thiouracil[37, 38, 39] und 4-Methyl-2-thiouracil[40, 41, 42] als die Mittel der Wahl erwiesen. Nach RAWSON und Mitarbeitern[43] beruht die Wirkung von Thiouracilen auf die Basedow-Schilddrüse ebenfalls darauf, daß die Aufnahme und Verarbeitung von Jod durch die Drüse verhindert wird.

Tabelle 2. *Nebenwirkungen des 2-Thiouracil.* (Nach W. VAN WINKLE[44] und D. MOORE[45].) Zahlenangaben in Prozent von 5745 bzw. 1091 Fällen.

Nebenwirkungen	VAN WINKLE jr.	MOORE
Leukopenie	4,4	3,0
Granulocytopenie	2,5	1,8
Hautreaktionen*	3,3	—
Arzneimittelfieber	2,7	5,0
Drüsenschwellungen** . .	—	5,0
Sonstige***	0,1	2,0
Gesamt	13,0	16,8

Von den unter der Behandlung mit 2-Thiouracil beschriebenen *Nebenwirkungen* (Tabelle 2 und FISCHER, KOPF und LOESER[46]) kommt die klinisch gefürchtetste, nämlich die Veränderung des weißen Blutbildes, bei der üblichen Dosierung mit 4-Propyl- und 4-Methylthiouracil weit weniger häufig vor. Auch diese Substanzen rufen aber die durch die beschriebene Gegenregulation verursachten Veränderungen in der Schilddrüse hervor: Histologisch erkennbar an einer verstärkten Epithelproliferation und Hyperplasie[31], äußerlich sichtbar an der zunehmenden *Vergrößerung des Organes*. Die Hyperplasie geht mit einer so starken *Vaskularisation* einher, daß die empfohlene Anwendung der Thiouracilderivate zur Vorbereitung von Schilddrüsenoperationen erheblich eingeschränkt wird[47]. RAWSON und Mitarbeiter[43] haben zwar gefunden, daß sich bei kombinierter Anwendung von Thiouracil und Jodid die Basedow-Schilddrüse zur Operation ruhigstellen läßt; es ist indessen nichts darüber bekannt, ob dieser merkwürdige Effekt, der auf eine Herabsetzung der Überempfindlichkeit der basedowifizierten Schilddrüsen gegenüber thyreotropem Hormon zurückgeführt wird, auch therapeutische Bedeutung haben wird, um durch Thiouracile allein hervorgerufene Schilddrüsenvergrößerungen zu vermeiden. Neuerdings wird beschrieben, daß Vitamin C die Entwicklung des Kohlkropfes beim Kaninchen hemmen kann[48], und daß bei gleichzeitiger Verabreichung von Vitamin-A-Methyläther die sonst durch Methylthiouracil hervorgerufene Schilddrüsenvergrößerung der Versuchstiere ausbleibt[49].

* Meist Urticaria, ferner papulöse, makulöse, morbiliforme, akneähnliche Exantheme; Erytheme, Pruritus, Ödeme u. a.

** Mikulicz-Syndrom.

*** Allgemeine Ermattung, Albuminurie, Leberschädigungen, Gelbsucht, Anämien, Purpura, Mund- und Nasenschleimhautentzündungen u. a.

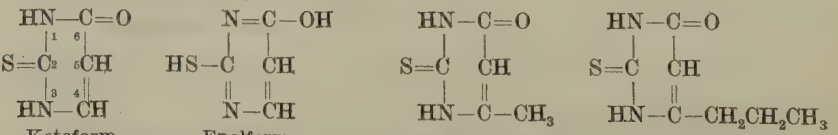
Die beschriebenen vergleichenden Untersuchungen von Mackenzie[1], Astwood[3, 4, 5], McGinty[10], Jensen[7] und Mitarbeitern über den Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und „antithyreoidaler Aktivität" basieren in erster Linie auf den Befunden an der *Schilddrüse* der Versuchstiere. Glock[50] hat indessen bereits darauf aufmerksam gemacht, daß das Verhalten der Schilddrüse allein zur Kennzeichnung der Wirkung solcher Stoffe nicht maßgebend zu sein braucht. In jedem Falle sollte vielmehr neben der „antithyreoidalen Aktivität" auch der *Einfluß auf den Gesamtstoffwechsel* zur Beurteilung herangezogen werden. Da es zudem nach dem oben Gesagten noch immer an einem Arzneimittel fehlt, das nachhaltige stoffwechselsenkende Wirkung mit guter Verträglichkeit verbindet, ohne eine Vergrößerung der Schilddrüse und vermehrte Vaskularisation hervorzurufen, ist es unseres Erachtens weiter nötig, außer dem Stoffwechsel und der Schilddrüse auch andere Organe und das Blutbild auf etwaige Veränderungen hin zu untersuchen. Die beschriebene Bedeutung der Hypophyse für die Funktionen der Schilddrüse legt es ferner nahe, diesem Organ besondere Aufmerksamkeit zu widmen, wofür eine Mitteilung von Hölscher[51] die ersten Anhaltspunkte bietet.

In der vorliegenden Arbeit haben wir eine derartige kombinierte Prüfung des 2-Thiouracil und einiger seiner Derivate begonnen. Zu diesem Zwecke wurde der Einfluß sicher „antithyreoidal" wirkender Mono- und Dialkylverbindungen des 2-Thiouracil auf Stoffwechsel, Schilddrüse, Hypophyse, Blut und andere Organe untersucht und die erhaltenen Wirkungen mit denen von Aminoverbindungen des 2-Thiouracil verglichen, die — soweit bisher bekannt ist — keine „antithyreoidale Aktivität" entfalten (Tabelle 1). Maßgebend für die Auswahl der Substanzen waren folgende Gesichtspunkte: Beeinflussung der Wirkung des 2-Thiouracil durch 1. Methylierung (Zahl und Stellung der Methylgruppen), 2. Aminierung, 3. gleichzeitige Aminierung und Methylierung.

II. Darstellung und Eigenschaften der geprüften Verbindungen.

Die chemische Konstitution der von uns geprüften Verbindungen, sämtlich Abkömmlinge des 2-Thiouracil, zeigt die folgende Formelübersicht:

1. 2-Thiouracil und 4-Alkyl-2-thiouracile



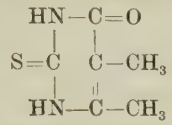
Ketoform Enolform

I 2-Thiouracil (2-Mercapto-6-oxy-pyrimidin)

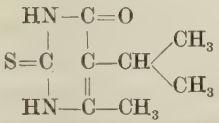
II 4-Methyl-2-thiouracil

III 4-Propyl-2-thiouracil

2. 4,5-Dialkyl-2-thiouracile

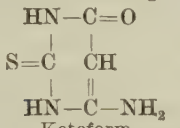


IV 4,5-Dimethyl-2-thiouracil

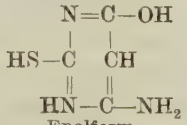


V 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil

3. 4-Amino-Verbindungen des 2-Thiouracil

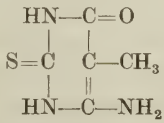


Ketoform



Enolform

VI 4-Amino-2-thiouracil
(2-Mercapto-4-amino-6-oxy-pyrimidin)



VII 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil

Einige Eigenschaften der aufgeführten Substanzen haben wir in Tabelle 3 zusammengestellt. Alle sind farb- und geruchlos, lassen sich aus Wasser oder verdünntem Ammoniak kristallisieren und haben hohe Schmelz- oder Zersetzungspunkte. In kaltem Wasser und in den üblichen organischen Lösungsmitteln sind sie schwer löslich, lösen sich dagegen unverändert in Ammoniak und, unter Salzbildung, in verdünnten Laugen. Die Alkali-, Magnesium- und Kalziumsalze sind in Wasser löslich und reagieren durch Hydrolyse alkalisch. Eine 25%ige

Tabelle 3. *Eigenschaften von 2-Thiouracil-Derivaten.*

Substanz	Schmelzpunkt Grad Celsius	Aussehen	Geschmack
2-Thiouracil (I)	330 (Zersetzung)	lange prismatische Nadeln aus H_2O	fade, schwach bitter, schwefelig
4-Methyl-2-thiouracil (II) . . .	330 (Zersetzung)	Prismen aus H_2O	stark bitter
4-Propyl-2-thiouracil (III) . . .	216	Stäbchen aus H_2O	stark bitter
4,5-Dimethyl-2-thiouracil (IV) .	284 (Zersetzung)	Nadeln aus H_2O	intensiv bitter
4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil (V)	253	Blättchen aus verdünntem NH_3	bitter, widerlich
4-Amino-2-thiouracil (VI) . . .	Zersetzung ab 330	sechseckige Platten aus verdünntem NH_3	schwach süß, dann schwefelig
4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII)	Zersetzung ab 330	schiefwinklig zugespitzte Plättchen aus verdünntem Ammonacetat	indifferent, schwach, schwefelig

Lösung des Natriumsalzes vom 4-Methylthiouracil hat beispielsweise ein p_H von 10,3. 2-Thiouracile, die in 4-Stellung eine Alkyl-Gruppe tragen, haben stark bitteren Geschmack, der schwächer schon dem Thiouracil selbst anhaftet. Der bittere Geschmack fehlt den Aminoverbindungen. Das 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII) ist fast geschmacklos, die alkylfreie Substanz (VI) schwach süß.

Die *Darstellung* der untersuchten 2-Thiouracilabkömmlinge erfolgte allgemein durch Kondensation des Natriumsalzes vom Thioharnstoff mittels der Natriumverbindungen der geeigneten Ketosäure- oder Cyansäureester. Unseres Wissens unbekannt waren bisher das 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil (V) und das 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII).

Versuche, das *2 Thiouracil (I)* nach der Vorschrift von Wheeler und Liddle[52] durch Kondensation von Na-Formylessigester in Äther mit einer wäßrigen Lösung von Thioharnstoff zu gewinnen, gaben Ausbeuten, die weit unter der mit 46% der Theorie angegebenen lagen. Mit mehr als 60%iger Ausbeute läßt sich I nach folgendem Verfahren darstellen: Kondensation von 1 Mol Thioharnstoff, gelöst in absolut alkoholischer Lösung von überschüssigem Na-Äthylat, mit dem in Xylol aus 1 Mol Essigester und 1 Mol Ameisensäureester nach Wislicenus und Bindemann[53] bereiteten Na-Formylessigsäure-äthylester.

Darstellung von 2-Thiouracil (2-Mercapto-6-oxy-pyrimidin, I): 1,5 Mol Natriummetall werden in 800 cm³ wasserfreiem Äthanol gelöst und darin 2 Mol trockener Thioharnstoff als Natriumsalz gebunden. Zu dieser Lösung fügt man den folgendermaßen bereiteten Natrium-formyl-essigester: 2 Mol Natriummetall werden unter 350 cm³ absolutem Toluol oder Xylol gepulvert, dann 650 cm³ desselben Lösungsmittels hinzugefügt und bei 70° C 2 Mol wasserfreies Äthanol zutropfen gelassen. Nach beendigter Alkoholatbildung, die sich durch Aufhören der Gasentwicklung und Ausscheiden des Alkoholates kundtut, gibt man bei Zimmertemperatur ein Gemisch von je 2 Mol über Kalziumchlorid destilliertem Essigester und Ameisensäure-äthylester unter Rühren so zu, daß die Umsetzung nicht zu heftig wird. Eventuell muß man zuvor durch kurzes Erwärmen im Wasserbad die Reaktion in Gang bringen. Im Laufe von 10 Stunden, wobei man öfter umschüttelt, ist die hellgelbe Masse durch Ausscheidung des Natriumsalzes völlig erstarrt und wird, womöglich unter Zuhilfenahme von etwas wasserfreiem Alkohol, zu obigem Ansatz gegeben. Das Gemisch hält man 5 Stunden bei 80—90° C, wobei unter gutem Rühren eine beige-gelbe Suspension entsteht. Anschließend werden die Lösungsmittel im Vakuum so vollständig wie möglich abgedampft und die zurückbleibende Natriumverbindung des Kondensationsproduktes unter guter Außenkühlung in der gerade ausreichenden Menge Eiswasser gelöst. Beim Ansäuern mit Eisessig fällt das rohe 2-Thiouracil aus. Umkristallisiert wird aus Wasser oder sehr verdünntem Ammoniak. Der Schmelzpunkt der farblosen Prismen liegt bei 330° (Korr.) unter Zersetzung. Die Ausbeute beträgt 140—160 g (= 52—62% der Theorie).

2,598 mg Substanz: 0,500 cm³ N_2 (746 Torr, 25°);
5,513 mg Substanz: 4,22 cm³ n/50 KJO_3
$C_4H_4ON_2S$ Ber. % N 21,86% S 24,98
Gef. %N 21,64% S 24,54.

Als *4-Methylthiouracil (II)* stand uns ein Präparat der Firma Knoll AG., Ludwigshafen, als *4-Propyl-2-thiouracil (III)* ein solches der Firma W. Herbrand, Gengenbach *, zur Verfügung **. Eine nach den Angaben von Wheeler und McFarland[54] ausgeführte eigene Bereitung von II aus Thioharnstoff, Natriummethylat und Acetessigester, lieferte 85—90% der theoretischen Ausbeute.

Das 4,5-Dimethyl-2-thiouracil (IV) wurde in Anlehnung an die Beschreibungen von Anderson[9] und Hull[55] und Mitarbeitern hergestellt. Indessen haben wir den α-Methyl-acetessigsäure-äthylester erst nach der Bildung des Natriumsalzes von Thioharnstoff zugeführt und dadurch die Ausbeute bis auf 88% der Theorie steigern können. Den Methyl-acetessigsäureäthylester haben wir, anders als die genannten Autoren[9], nach Nef[56] aus Acetessigester und Dimethylsulfat dargestellt (Ausbeute 70—85% der Theorie).

Das 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil (V) gewannen wir erstmals durch Kondensation aus dem Natriumsalz des Thioharnstoffes mit α-Methyl-acetessigsäureäthylester bzw. α-Isopropyl-acetessigester in absolutem Äthanol. Die Ausbeuten betrugen maximal 79% der Theorie. Den Isopropyl-acetessigsäureäthylester stellten wir nach der kurzen Angabe von Rupe und Courvoisier[57] aus Natrium-Acetessigester und Isopropylbromid in Gegenwart von Kaliumjodid dar (Ausbeute 58% der Theorie).

Darstellung von 5-Isopropyl-4-methyl-2-thiouracil (2-Mercapto-4-methyl-5-isopropyl-6-oxy-pyrimidin, (V): 23 g (= 1 Mol) Natriummetall löst man in 500 cm³ wasserfreiem Methanol und trägt noch warm 38 g (= 0,5 Mol) trockenen, gepulverten Thioharnstoff ein. Nach dessen Lösung zum Natriumsalz läßt man langsam 86 g (= 0,5 Mol) α-Isopropyl-acetessigester zufließen und erhitzt 4 Stunden zum Sieden. Dann destilliert man bei schwachem Vakuum im Wasserbad größtenteils ab, verdünnt den Ansatz, aus dem das Natriumsalz des Reaktionsproduktes zum Teil ausgefallen sein kann, rasch mit 4 Litern Eiswasser und stumpft unter Kühlung mit halbkonzentrierter Salzsäure ab. Beim Ansäuern mit Essigsäure fällt das Thiouracilderivat in schönen farblosen Blättchen aus, die aus sehr verdünntem Ammoniak umkristallisiert werden. Schmelzpunkt 253° (korr.). Ausbeute 65 g (= 79% der Theorie).

5,737 mg Substanz: 8,027 mg CO_2 und 2,324 mg H_2O
3,224 mg Substanz: 0,755 mg N_2 (746 Torr, 25°)
5,710 mg Substanz: 3,64 cm³ n/50 KJO_3
$C_5H_7ON_3S$ Ber.: % C 38,24 % H 4,46 % N 26,73 % S 20,40
Gef.: % C 38,15 % H 4,53 % N 26,52 % S 20,43.

Ist die Umsetzung des Isopropyl-acetessigesters nicht ganz vollständig verlaufen, so bildet sich daraus beim Ansäuern am Geruch erkennbare Isovaleriansäure.

* Das verwendete Präparat enthielt eine höher schmelzende Komponente, die sich beim Umkristallisieren aus Wasser abtrennen ließ. Der Schmelzpunkt lag danach bei 212—214° unkorr. (4-n-Propyl-2-thiouracil nach Literatur[9] Smp. = 216—218° korr.).

** Den genannten Firmen haben wir für die bereitwillige Überlassung der Substanzen zu danken.

Der zur Synthese von 5-Isopropyl-4-methyl-2-thiouracil erforderliche α-Isopropyl-acetessigsäure-äthylester wurde folgendermaßen gewonnen:

Das als Ausgangsmaterial dienende Isopropylbromid erhält man durch langsames Abdestillieren eines Gemisches von 120 g (= 2 Mol) Isopropanol und 1000 cm³ Bromwasserstoffsäure (d = 1,49) über eine 30 cm lange Widmerkolonne. Das Destillat wird über Kalziumchlorid getrocknet und rektifiziert. Ausbeute 155 g (= 63% der Theorie) vom Siedepunkt 59—60°.

Zu einer Lösung von 30 g Natriummetall in 500 cm³ wasserfreiem Äthanol gibt man ein Gemisch von 162 g (1,25 Mol) trockenem, destilliertem Acetessigester und 155 g (1,25 Mol) trockenes Isopropylbromid. Zuletzt trägt man 150 g scharf getrocknetes Kaliumjodid ein. Nach 36stündigem Kochen unter Feuchtigkeitsausschluß ist die Lösung neutral. Es wird von ausgeschiedenem und ungelöst gebliebenem Salz abgesaugt, das Filtrat mit kalter 2 n Schwefelsäure auf Kongo angesäuert und der Ester ausgeäthert. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Lösungsmittels wird fraktioniert. Siedepunkt$_{12}$ 87—90°. Ausbeute 126 g (= 58% der Theorie).

Aus Thioharnstoff, α-Cyanessigsäure-äthylester und Natriummethylat in Methanol entstand nach Traube[58] glatt das *4-Amino 2-thiouracil* (VI) in 90%iger Ausbeute. Das unseres Wissens nicht beschriebene 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII) wurde analog mit α-Cyan-propionsäure-äthylester dargestellt. Den Ester hatte man bisher entweder aus α-Brompropionsäure-äthylester und Kaliumcyanid im Bombenrohr[59] oder aus Natrium-Cyanessigester und Methyljodid[60] gewonnen. Einfacher, rascher und mit über 85%iger Ausbeute erhält man ihn nach unseren Erfahrungen aus Natrium-Cyanessigester und Dimethylsulfat in der nachstehend beschriebenen Weise.

Darstellung von 5-Methyl-4-amino-2-thiouracil (2-Mercapto-4-amino-5-methyl-6-oxy-pyrimidin (VII): 46 g (= 2 Mol) Natriummetall löst man unter Feuchtigkeitsausschluß in 1500 cm³ wasserfreiem Methanol, fügt noch warm unter gutem Rühren hierzu 76 g (= 1 Mol) fein getrockneten und pulverisierten Thioharnstoff und nach dessen Lösung 127 g (= 1 Mol) α-Cyanpropionsäureäthylester. Es wird 2 Stunden zum Sieden erhitzt, dann das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der feste Rückstand unter guter Kühlung in verdünntem eiskaltem Ammoniak gelöst und schließlich mit kalter halbkonzentrierter Salzsäure auf p_H5 angesäuert. Umkristallisation aus viel sehr verdünntem Ammoniak. Schöne farblose Plättchen, die bis 350° nicht schmelzen, sich aber oberhalb 330° (korr.) zersetzen. Geschmack indifferent. Ausbeute bis 128 g (= 90% der Theorie).

5,334 mg Substanz: 10,216 mg C_2O und 3,103 mg H_2O
3,085 mg Substanz: 0,421 cm³ N_2 (750 Torr, 20°)
4,865 mg Substanz: 2,67 cm³ n/50 KJO_3
$C_5H_{12}ON_2S$ Gef.: % C 52,22 % H 6,50 % N 15,34 % S 17,60
Ber.: % C 52,12 % H 6,57 % N 15,21 % S 17,40.

Der zur Synthese von 5-Methyl-4-amino-2-thiouracil erforderliche α-Cyan-propionsäureäthylester wurde folgendermaßen gewonnen:

Unter Feuchtigkeitsausschluß löst man 46 g (= 2 Mol) Natriummetall in 750 cm³ wasserfreiem Äthanol, gibt unter Kühlung 226 g (= 2 Mol) frischen α-Cyanessigsäure-äthylester hinzu und unter lebhaftem Rühren so langsam 252 g (= 2 Mol) frisch destilliertes Dimethylsulfat (Siedepunkt$_{12}$ 74—75°), daß die Temperatur nicht über 40° steigt. Nach beendeter Hauptreaktion, die unter Ausscheidung von Natrium-methosulfat erfolgt, wird am Rückfluß erhitzt, bis

die Reaktion des Ansatzes gegen Lackmus neutral ist (etwa 2 Stunden). Man saugt vom methylschwefelsauren Natrium ab und arbeitet nach einer der folgenden Weisen auf: a) Aus dem Filtrat wird der Alkohol in schwachem Wasserstrahlvakuum vertrieben, von restlichem Salz abgetrennt und rektifiziert. b) Das zurückbleibende Öl wird vor der Destillation mit viel Wasser gewaschen, direkt mittels Kalziumchlorid getrocknet und im Vakuum destilliert. c) Die äthanolische Lösung des Reaktionsproduktes wird direkt mit Wasser verdünnt, mit Natriumchlorid gesättigt und mit Äther extrahiert. Waschen des Äthers, Trocknen und Destillation wie vorher. Ausbeute 178—220 g (70—87% der Theorie). Farbloses Öl vom Siedepunkt$_{12}$ 78—80°.

III. Methodik.

Die Untersuchungen wurden von April 1947 bis April 1948 an mehr als 300 Tieren ausgeführt. Als Versuchstiere dienten 85—170 g schwere männliche und weibliche Albinoratten, die unter gleichen Bedingungen (Drahtkäfige, heller luftiger Raum, 20—22° C) standen. Die Nahrung setzte sich aus Küchenabfällen mit täglichen Beigaben an Hafer, Maismehl und Kleie zusammen. Trinkwasser stand in Sauggefäßen beliebig zur Verfügung.

Versuchsperioden und Verabreichungsart der Substanzen. Jeder Versuch, mit Gruppen von 4—12 Tieren ausgeführt, wurde in eine Vorperiode von 8—14 Tagen, eine *Behandlungszeit* von 22 Tagen und eine wiederum behandlungsfreie Nachperiode von 14—26 Tagen unterteilt. Während der Behandlungszeit verabreichten wir den Ratten je Tag und Tier 0,1 g oder 0,5 g Substanz je Kilogramm Körpergewicht. Diese Menge, die bei den durchweg schwerlöslichen Substanzen täglich frisch in so viel Wasser suspendiert wurde, daß auf 100 g Tier 1 cm^3 Wasser kam, gaben wir einmal täglich, im allgemeinen nüchtern, mit der Schlundsonde.

Bestimmung des Körpergewichtes. Von den im Versuch befindlichen Tieren wurde täglich nüchtern das Körpergewicht bestimmt. Aus den Werten des mittleren Tagesgewichtes der Tiere einer Gruppe bildeten wir von jeweils drei aufeinander folgenden Tagen erneut das Mittelgewicht. Es fanden nur Tiere Berücksichtigung, die über die ganze Versuchsdauer am Leben blieben. Das zweite, mittlere Mittelgewicht bildet die Grundlage unserer graphischen Darstellungen der Körpergewichtsverhältnisse. Als *Ausgangsgewicht* bezeichnen wir das mittlere Mittelgewicht der drei letzten Tage der Vorperiode einer jeden Gruppe.

Ermittlung des Sauerstoffverbrauches. Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches geschah im wesentlichen nach den Angaben von Loeser und Mitarbeitern[61]. Die Verwendung von Ratten erforderte indessen eine Thermostatentemperatur von 28°. Ferner kamen nur 12—16 Stunden nüchtern gehaltene Tiere zur Messung. An den Meßtagen selbst gaben wir während der Behandlungszeit die Substanzen erst im Anschluß an den Stoffwechselversuch. Die Auswertung geschah wie folgt: Von jedem Tier einer jeden Gruppe bestimmten wir in der Vorperiode dreimal in Abständen von 3 Tagen den Sauerstoffverbrauch (cm^3/g und Stunde). Das Mittel dieser Werte setzten wir für jede einzelne Ratte = 100% (mittlerer Ausgangswert). Während der Behandlungs- und der Nachperiode wurde jede Einzelmessung eines jeden Tieres jeder Gruppe in Prozent des mittleren Ausgangswertes ausgedrückt. Das arithmetische Mittel dieser, ebenfalls in Abständen von 3 Tagen bestimmten Prozentwerte einer Tiergruppe bildet für den jeweiligen Versuchstag die maßgebliche Kennzahl (vgl. z. B. Tabelle 6 und 7, S. 284 und 285).

Histologische Untersuchung der Organe. Zur histologischen Untersuchung der Organe wurden jeweils 3—6 Tiere einer jeden Gruppe in Abständen von 3—12 Tagen durch Entbluten getötet und folgende Organe sorgfältig herauspräpariert: Schilddrüse, Hypophyse, Keimdrüsen, Nebennieren, Nieren und Leber. Diese wurden mit bloßem Auge auf Veränderungen hin geprüft und die innersekretorischen Drüsen, bei den paarigen gemeinsam, in frischem Zustande gewogen. Das *Gewicht* eines jeden Organes wurde auf 100 g Körpergewicht bezogen und das arithmetische Mittel aus den so erhaltenen Werten einer Tiergruppe des jeweiligen Wägetages gebildet (vgl. z. B. Tabelle 16, S. 292). Die Organe haben wir mindestens 12 Stunden lang in einer 10%igen Formalinlösung fixiert, auf die übliche Weise in Paraffin eingeschlossen und die Serienschnitte, mit Mayers Hämalaun und Eosin gefärbt, in Caedax* eingebettet.

Allgemeinzustand. Die tägliche Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere erstreckte sich auf Freßlust, Aktivität, Körpertonus sowie vielleicht auftretende äußerlich erkennbare Veränderungen und Funktionsstörungen. Ferner wurde die Sterblichkeit ermittelt.

IV. Wirkungen auf den Allgemeinzustand.

Thiouracil (I), seine 4-Alkylderivate (II und III) und die 4,5-Dialkylderivate (IV und V) setzen in den ersten Tagen der Verabreichung die *Freßlust* der Tiere herab. Wir führen das auf den bitteren Geschmack dieser Verbindungen zurück (vgl. Tabelle 3), da die nicht bitteren Aminoverbindungen des 2-Thiouracil (VI und VII) die Freßlust nicht beeinträchtigen.

Die *Aktivität* der Versuchstiere wurde durch alle untersuchten Thiouracilderivate vermindert: Erkennbar an Ermüdungserscheinungen, allgemeiner Trägheit sowie verminderter Abwehr- und Angriffslust. Während bei den mit Thiouracil und dessen Mono-Alkylderivaten II und III behandelten Ratten diese Erscheinungen im zweiten Drittel der Behandlungszeit ganz plötzlich verschwinden, dauern sie unter dem Einfluß der 4,5-Dialkylabkömmlinge IV und V während der ganzen Verabreichungszeit an und verlieren sich erst in der Nachperiode. Die Wirkung der Aminoverbindungen VI und VII klingt bereits nach wenigen Behandlungstagen langsam ab. Auffällig ist der starke, aber kurz dauernde Anfangseffekt, den 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil hervorruft und der an die Wirkung eines Beruhigungsmittels erinnert.

Tabelle 4 enthält eine Übersicht über die Letalität und die äußerlich erkennbaren Nebenwirkungen, die sich in Abhängigkeit von der Dosis und der verabreichten Substanz ergaben. Als äußerlich sichtbare Nebenwirkungen wurden reversible Lähmungen und knotige *Schwellungen der Speicheldrüsen* beobachtet. Diese Schwellungen unterscheiden sich von den häufiger auftretenden Drüsenabszessen normaler Tiere, die fast immer von infizierten Bißstellen ausgehen, dadurch, daß sie wahrscheinlich durch eine Ausscheidung der verabfolgten Substanzen verursacht werden. Derartige geschwollene Drüsen enthalten nämlich

* Präparat der Farbwerke Bayer, Leverkusen.

grützbeutelähnliche Einlagerungen, die an Menge mit der Behandlungszeit zunehmen und sich unter Fistelbildung nach außen entleeren können. Sekundäre Infektionen kommen dann oft vor. Es sei darauf hingewiesen, daß auch klinisch während der Behandlung mit Thiouracil Drüsenschwellungen im Bereich des Halses beobachtet werden (vgl. Tabelle 2).

Lähmungen treten während der ersten Behandlungswoche im Bereiche der hinteren Extremitäten auf. Sie halten, zum Teil langsam nachlassend, über die ganze Behandlungszeit an und verschwinden, wenn überhaupt, erst allmählich nach dem Absetzen der Substanzen. Das Ausmaß der Speicheldrüsenveränderungen und Lähmungen hängt, wie Tabelle 4 zeigt, außer von der Konstitution der zugeführten Verbindung von der Höhe der verabfolgten Dosis ab. Bei der kleinen

Tabelle 4. *Speicheldrüsenveränderungen, Lähmungen und Letalität bei Behandlung von Ratten mit 2-Thiouracil und Thiouracilderivaten.*

Werte in Prozent von je 20 behandelten Tieren. Kontrollwerte von 30 Tieren. Eingeklammerte Werte von einer kleineren Zahl Ratten stammend.

Substanz	Dosis g/kg und Tag	Speichel-drüsen-verän-derungen	Läh-mungs-erschei-nungen	Letalität
2-Thiouracil (I)	*0,5*	*25*	*40*	*25*
	0,1	∅	5	5
4-Methyl-2-thiouracil (II)	*0,5*	*55*	*40*	*50*
	0,1	45	5	15
4-Propyl-2-thiouracil (III)	0,1	(∅)	(∅)	(12)
4,5-Dimethyl-2-thiouracil (IV) . . .	*0,5*	*40*	*5*	*30*
4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil (V)	0,1	(10)	(∅)	(50)
4-Amino-2-thiouracil (VI)	0,1	5	(∅)	10
5-Methyl-4-amino-2-thiouracil (VII) .	0,1	∅	∅	10
Unbehandelte Kontrollen	—	∅	∅	10

Tagesdosis (0,1 g/kg) führen, abgesehen von 4-Methylthiouracil (II), das die angegebenen Nebenwirkungen oft hervorruft, und vom Methylaminothiouracil (VII), das die Tiere nicht beeinflußt, die übrigen Substanzen nur vereinzelt derartige Erscheinungen herbei. Durch hohe Tagesgaben (0,5 g/kg) wird, soweit untersucht, die Zahl der befallenen Tiere auffällig vermehrt. Am häufigsten wurden wieder die mit Methylthiouracil behandelten Ratten in Mitleidenschaft gezogen.

Die *Letalität* ist bei 0,1 g/kg am größten bei Einwirkung von Methylisopropyl-thiouracil (V). Der Ausfall an Tieren war hier so erheblich, daß der Versuch vorzeitig abgebrochen werden mußte. In allen anderen Fällen weicht die Sterblichkeit nicht erheblich von der unbehandelter Tiere ab (Tabelle 4). Bei hoher Dosierung (0,5 g/kg) geht die Letalität parallel der Häufigkeit der beschriebenen Nebenerscheinungen. 4-Methylthiouracil wirkt danach toxischer als 4,5-Dimethylthiouracil (IV) und 2-Thiouracil. Bavin und Goodchild[62] geben als letale Dosis

bei oraler Anwendung von 4-Methyl-2-thiouracil 1500 mg/kg, von 4-Propyl-2-thiouracil 1250 mg/kg Ratte an. Während die Einführung einer Methylgruppe in die 4-Stellung des Thiouracil die Toxizität steigert, nimmt diese bei zusätzlichem Ersatz des 5ständigen H-Atoms durch $—CH_3$ wieder ab[63].

Das 4,5-Dimethyl-2-thiouracil verhält sich damit dem 4-Methyl-2-thiouracil gegenüber ähnlich wie 6,9-Dimethylflavin gegenüber 9-Methylflavin. Kuhn und Boulanger[64] fanden letzteres für die Maus toxisch, ersteres bei gleicher Dosierung verhältnismäßig ungiftig. Die annähernd gleiche Toxizität von Thiouracil (I) und Dimethylthiouracil (IV) entspricht den Beobachtungen an den Stoffpaaren Alloxazin—6,7-Dimethyl-alloxazin[64] und Atophan—„Dimethyl-atophan" (2-Phenyl-6,7-dimethyl-chinolin-4-carbonsäure[65]. Ersetzt man die 5ständige Methylgruppe in IV durch eine Isopropylgruppe, so steigt die Giftigkeit auf das Doppelte. Ähnlich verhalten sich hinsichtlich der letalen Dosen bei Kaninchen Diäthyl-barbitursäure (Veronal) und Äthyl-isopropyl-barbitursäure (Ipral)[66].

Die in unseren Versuchen zugeführten Substanzmengen, 0,1 und 0,5 g/kg und Tag, entsprechen, umgerechnet auf den Menschen (durchschnittliches Körpergewicht 70 kg), einer täglichen Dosis von 7 g bzw. 35 g. Verglichen mit den gebräuchlichen therapeutischen Gaben, z. B. 3mal 0,1—0,2 g 4-Methylthiouracil täglich, haben wir unseren Tieren mehr als das Hundertfache verabreicht. Dies geschah absichtlich, um Nebenerscheinungen sicher erfassen zu können, da die Ratte im Vergleich zum Menschen gegenüber den Thiouracilen weniger empfindlich ist. Die Letalität, welche bei Anwendung von Thiouracil beim Menschen nach den üblichen Gaben von etwa 10 mg/kg täglich zu 0,5—0,7% gefunden wurde[45], liegt bei der zehnfach größeren Dosis für die Ratte in der gleichen Größenordnung. Nach Astwood und van der Laan[37] ist 4-Propyl-2-thiouracil beim Menschen 10mal, an Ratten 5mal wirksamer als 2-Thiouracil.

Der Tod der Tiere trat in unseren Versuchen durch die Einwirkung der Substanzen im allgemeinen nach Absinken des Körpergewichtes und stundenlang andauernden Krämpfen ein.

V. Die Wirkung auf den Stoffwechsel.

1. 2-Thiouracil (I) und 4-Alkylderivate [4-Methyl-2-thiouracil (II) und 4-Propyl-2-thiouracil (III)]. Das Verhalten des Stoffwechsels, gemessen am Sauerstoffverbrauch, haben wir in 2 Versuchsreihen studiert, die sich in der angewandten Menge der Stoffe unterscheiden. Im ersten Falle gaben wir 0,1 g Substanz je 1 kg Körpergewicht und Tag, und zwar beim Thiouracil (I) ausgehend von 2mal 12 Tieren, beim Methylthiouracil (II) von 12 Tieren und beim Propylthiouracil (III) von 8 Tieren. Im zweiten Falle verglichen wir die Werte des Sauerstoffverbrauches, die nach Gaben von 0,5 g Thiouracil bzw. Methylthiouracil je 1 kg Körpergewicht und Tag bei je 12 Tieren[67] erhalten wurden. Die

Einzelmeßwerte des O_2-Verbrauches während der Vor-, der Behandlungs- und der Nachperiode sind für jedes Tier in den Tabellen 6—10 zusammengestellt (s. S. 284—287). Die Abb. 1 und 2 zeigen, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und der gegebenen Substanz, den Sauerstoffverbrauch in Prozent des mittleren (= 100% gesetzten) Wertes der Vorperiode. Die eingetragenen Kennzahlen wurden, wie im methodischen Teil beschrieben, aus den Werten der Tabellen 6—12 (s. S. 284 bis 289) errechnet.

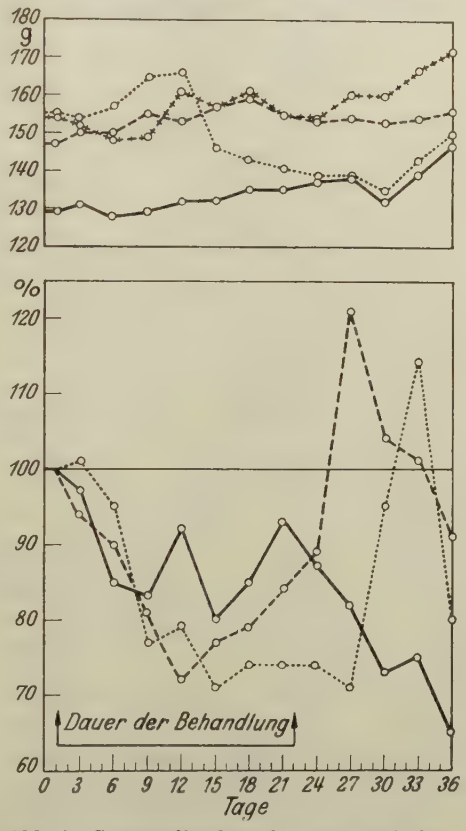


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch (unten) und Körpergewicht (oben) von Ratten bei täglicher Einwirkung von 0,1 g 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil und 4-Propyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Sauerstoffverbrauch in Prozent des mittleren (— 100 % gesetzten) Wertes der Vorperiode. Körpergewicht in Gramm. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert einer Gruppe von mindestens 4 Tieren. ——— 2-Thiouracil; — — — 4-Methyl-2-thiouracil; - - - - - - 4-Propyl-2-thiouracil; + + + Unbehandelte Vergleichstiere.

Aus den Abb. 1 und 2 ergibt sich zunächst, daß die geprüften Substanzen I, II und III, unabhängig von der Dosis, in der ersten Hälfte der 22 Tage dauernden Behandlungszeit den Stoffwechsel etwa gleichsinnig senken. Das Minimum des O_2-Verbrauches liegt nach Zufuhr der kleinen Dosis (0,1 g/kg) von Thiouracil 35%, von Methylthiouracil 28% und von Propylthiouracil 29% unter dem Normwert (100%), bei der großen Dosierung (0,5 g/kg) 36% (Thiouracil) bzw. 41% (4-Methylthiouracil). Es fällt auf, daß das Minimum bei den kleinen Gaben von 4-Alkyl-thiouracilen in der Behandlungsperiode liegt, beim Thiouracil dagegen erst am Ende der Nachperiode erreicht wird. Bei hoher Dosierung sinkt der O_2-Verbrauch unter dem Einfluß von I ebenso wie unter dem von II bis kurz nach der Behandlungsperiode ab und steigt dann, in beiden Fällen gleichartig, wieder an. Das reproduzierte auffallende Ergebnis, daß 2-Thiouracil bei Gaben von 0,1 g/kg und Tag den Stoffwechsel

maximal zwar später, dann aber viel nachhaltiger senkt als nach Verfütterung von 0,5 g/kg Tier und Tag wird, wie wir noch beschreiben werden, erhärtet durch das histologische Bild der Schilddrüse. Die besonders bei Einwirkung großer Substanzmengen auffällige Zunahme

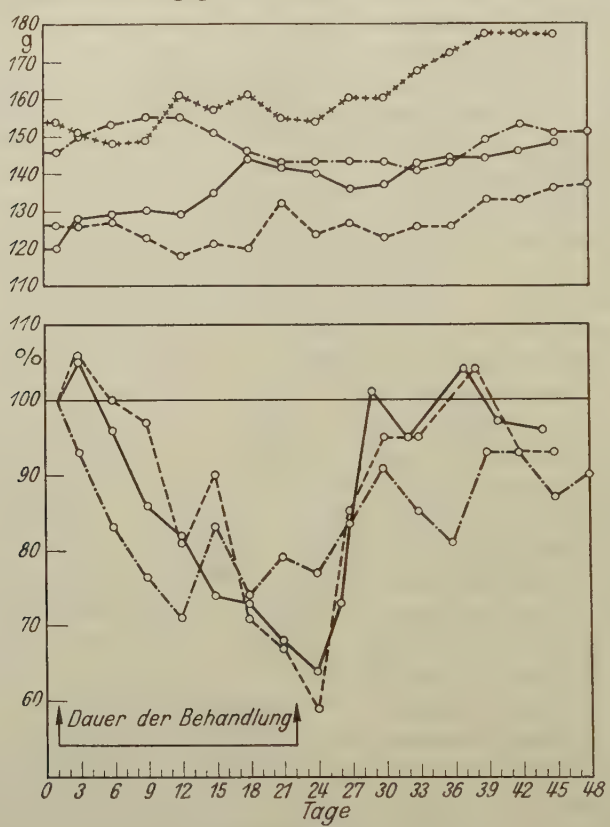


Abb. 2. Wie Abb. 1. Tägliche Einwirkung von 0,5 g 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil und 4,5-Dimethyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht. ——— 2-Thiouracil; — — — 4-Methyl-2-thiouracil; — · — · — · 4,5-Dimethyl-2-thiouracil; + + + Unbehandelte Vergleichstiere.

des Sauerstoffverbrauches kurz nach Beginn der Behandlung und der durch zeitweilige Anstiege unterbrochene Verlauf der Stoffwechselsenkung, sind unserer Meinung nach Ausdruck einer vorwiegend von der Hypophyse ausgehenden *Gegenregulation*. Ist z. B. die Resorption der zugeführten Verbindung zeitweilig geringer oder die Ausscheidung größer, so sinkt dadurch vorübergehend die Substanzmenge im Blut ab und die an Schilddrüsenhormon verarmte Drüse hat Zeit, Jod an sich zu reißen und Jodthyreoglobulin zu bilden. Die Gegenregulation

macht sich besonders um die Mitte der Behandlungsperiode und dann wieder nach Absetzen der Substanz bemerkbar. In letzterem Falle kann der Stoffwechsel vorübergehend solange über die Norm hinaus gesteigert werden, bis sich das Gleichgewicht in der Korrelation zwischen Schilddrüse und Hypophysenvorderlappen wieder eingespielt hat.

Beim 4-Propyl-thiouracil (III) hält die Hemmung der Jodaufnahme bzw. die der Bildung von Jodthyreoglobulin länger an als beim 4-Methylthiouracil. 0,1 g Thiouracil blockiert die Schilddrüse auch dann noch, wenn die Wirkung der beiden 4-Alkyl-thiouracile bereits völlig abgeklungen ist.

2. 4,5-Dialkylderivate des 2-Thiouracil. [4,5-Dimethyl-2-thiouracil (IV) und 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil, (V)]. Die 4,5-Dialkylderivate IV und V unterscheiden sich in ihrer stoffwechselsenkenden Wirkung nicht wesentlich von den Monoalkylderivaten des 2-Thiouracil (vgl. Abb. 1, 2 und 3, Tabellen 11 bis 13, S. 288—290). Unter der Einwirkung von 0,5 g IV je Kilogramm Tier erreicht der Sauerstoffverbrauch sein Minimum bereits in der Mitte der Behandlungsperiode, nach Zufuhr von 0,1 g/kg erst am Ende. Das Verhalten ist also gerade umgekehrt, wie nach den entsprechenden Tagesgaben von 4-Methylthiouracil. Das Sauerstoffminimum liegt nach Gaben von IV bei beiden Dosierungen 29% unter dem mittleren Ausgangswert. Es entspricht damit dem Wert, der nach kleinen Gaben der beiden Monoalkyl-thiouracile II und III gefunden wird, erreicht aber nicht die Werte von II und III bei hoher Dosierung. Bemerkenswert ist ferner, daß bei den verschieden hohen Gaben von 4,5-Dimethyl-thiouracil die Sauerstoffverbrauchswerte zwar nach Abschluß der Behandlung rasch

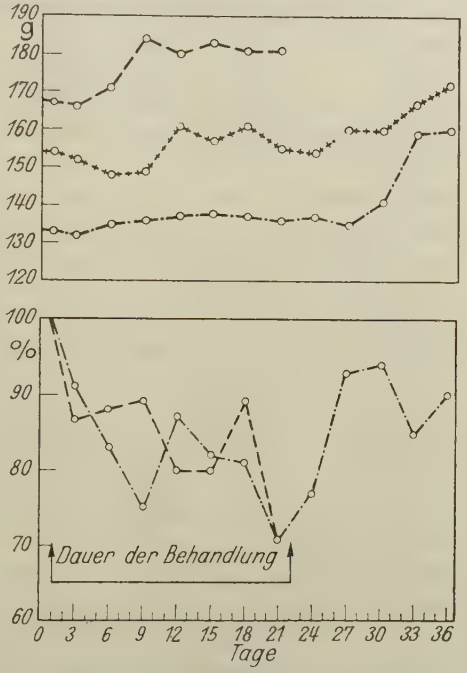


Abb. 3. Wie Abb. 1. Tägliche Einwirkung von 0,1 g 4,5-Dimethyl-2-thiouracil und 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht. Jeder Punkt der Kurve entspricht dem Mittelwert einer Gruppe von mindestens 3 Tieren.
— · — · — · 4,5-Dimethyl-2-thiouracil;
– – — — 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil;
+ + + Unbehandelte Vergleichstiere.

ansteigen, im Gegensatz zu den Monoalkylderivaten jedoch am Ende der Nachperiode den Normalwert noch nicht erreicht haben.

3. Amino-derivate des 2-Thiouracil [4-Amino-2-thiouracil (VI) und 5-Methy'-4-amino-2-thiouracil (VII)]. Die beiden Aminoverbindungen VI und VII (vgl. Tabellen 14 und 15, S. 290/291) unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf den Stoffwechsel der Ratte von allen bisher besprochenen Substanzen dadurch, daß sie in Mengen von 0,1 g/kg und Tag den Sauerstoffbedarf nicht rasch, sondern *nach und nach während der gesamten Behandlungsperiode erniedrigen* (Abb. 4; vgl. mit den Abb. 1 und 3).

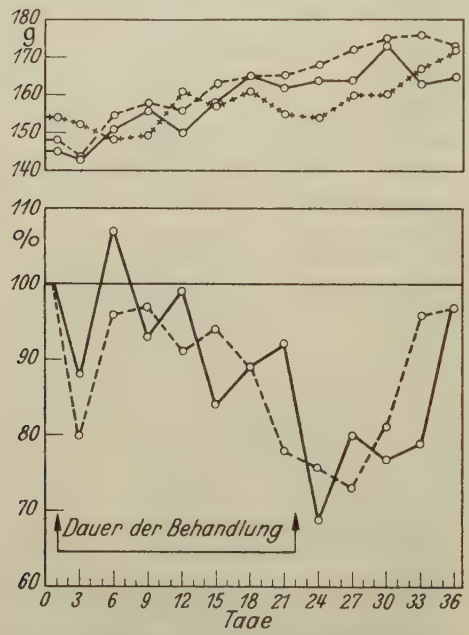


Abb. 4. Wie Abb. 1. Tägliche Einwirkung von 0,1 g 4-Amino-2-thiouracil und 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht.
——— 4-Amino-2-thiouracil;
— — — 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil;
+ + + Unbehandelte Vergleichstiere.

Das Minimum des Sauerstoffverbrauches liegt wie bei den untersuchten Mono- und Dialkylderivaten des 2-Thiouracil etwa 30% unter dem mittleren Wert der Vorperiode. Ihm folgt innerhalb von 9—12 Tagen ein gleichmäßiger Anstieg zur Norm. Am ehesten entspricht der Kurvenverlauf noch dem des 4,5-Dimethyl-thiouracil. In Abb. 4 fällt weiter auf, daß eine kurze intensive anfängliche Senkung des Stoffwechsels rasch ausgeglichen wird und der Sauerstoffverbrauch erst dann wieder, und zwar treppenförmig abnimmt. Die initiale Abnahme des Sauerstoffverbrauches trifft zeitlich mit dem beschriebenen besonders auffälligen Ruhigwerden der Tiere zusammen. Weiterhin sei hier schon darauf hingewiesen, daß das Wiederansteigen der Sauerstoffverbrauchswerte nach der primären Abnahme mit einer *Ruhigstellung der Schilddrüse* einhergeht. Man hat den Eindruck, daß die Stoffwechselsenkung bei 4-Amino-thiouracil und noch ausgesprochener bei 4-Amino-5-methylthiouracil „physiologischer" erfolgt als bei den anderen von uns geprüften 2-Thiouracil-Abkömmlingen. Die Versuchsresultate sind keineswegs einmalig; sie wurden auch in späteren Untersuchungen immer wieder gefunden.

VI. Die Wirkung auf das Körpergewicht.

Die parallel mit den Sauerstoffverbrauchswerten ermittelten Schwankungen des Körpergewichtes der Ratten sind aus den Abb. 1—4 zu entnehmen*.

Unter dem Einfluß hoher Dosen (0,5 g/kg) Thiouracil (I), Methylthiouracil (II) und Dimethyl-thiouracil (IV) bleibt das Körpergewicht der behandelten Ratten hinter dem der Kontrolltiere zurück. Dieser Vorgang hält auch noch nach dem Absetzen der Substanzen an, d. h. zu einer Zeit, zu der der Sauerstoffverbrauch bereits wieder normal geworden ist (Abb. 2). Diese Tatsache ist besonders deutlich bei Anwendung der Dimethylverbindung (IV).

Bei kleineren Substanzmengen ist die Wirkung auf das Körpergewicht geringer (Abb. 1 und 3). Das Gewicht der mit Dimethylthiouracil (IV) behandelten Tiere bleibt zwar, verglichen mit dem der Kontrollen, während der Behandlungszeit stehen, nimmt aber nach Beendigung der Behandlung sehr rasch wieder zu. 4-Propylthiouracil (III) verzögert in Gaben von 0,1 g/kg die Gewichtszunahme der Tiere ebenfalls.

Die Befunde von Bickenbach, Hess und Loeser[68], nach denen Ratten, die mit der Muttermilch 4-Methyl-2-thiouracil aufnehmen, gegenüber den Vergleichstieren stark in der Entwicklung zurückbleiben, deuten darauf hin, daß die von uns auch bei der Einwirkung anderer Alkyl-thiouracile beobachtete verzögerte Gewichtszunahme älterer Ratten auf einer Wachstumshemmung beruht. Andere Autoren[69] halten die Gewichtsverminderung durch Methylthiouracil ebenfalls für den Ausdruck einer Verlangsamung des Wachstums. Gestützt wird diese Auffassung durch unsere Versuche mit Amino-thiouracilen.

Im Gegensatz zu allen anderen von uns geprüften Thiouracilderivaten wird das Gewicht der Versuchstiere durch die *Amino-thiouracile* VI und VII bei gleicher Dosierung (0,1 g/kg) *nicht* beeinflußt. Sowohl nach Gaben von 4-Amino-2-thiouracil (VI) als auch nach denen von 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII) verhält sich das Körpergewicht wie das der Kontrolltiere (Abb. 4).

An sich müßte man annehmen, daß entsprechend dem Absinken des Sauerstoffverbrauches das Körpergewicht bei gleicher Nahrungsaufnahme der behandelten Ratten gegenüber dem der Kontrollen ansteigt, ähnlich wie dies an Schweinen, die mit dem Futter 0,1% Thiouracil erhalten hatten, tatsächlich nachgewiesen wurde[70]. Auch die bei Unterfunktion der Schilddrüse mögliche Wasserretention, wie sie beispielsweise während der Behandlung mit Methylthiouracil beim Menschen

* Auf die tabellarische Wiedergabe jeder einzelnen Wägung haben wir aus Platzgründen verzichtet.

beobachtet worden ist[41,42] und die eine Gewichtszunahme zur Folge haben müßte, spielt nach unseren Befunden für die Ratte keine Rolle. Wir haben auch nie andere sichtbare Zeichen von Schilddrüsenunterfunktion gesehen.

VII. Die Wirkungen auf die Schilddrüse und andere Organe.

Unsere Untersuchungen über die Beeinflussung der Organe durch Thiouracilderivate erstrecken sich, wie im methodischen Teil angegeben, über die gesamte Behandlungs- und Nachperiode.

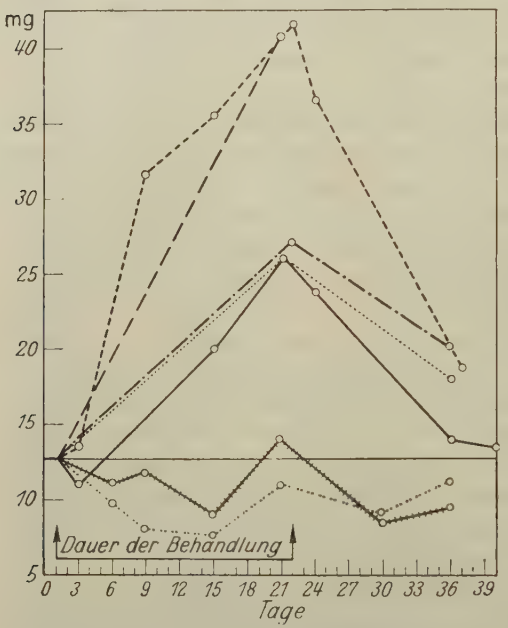


Abb. 5. Gewicht von Rattenschilddrüsen bei täglicher Einwirkung von 0,1 g 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil, 4-Propyl-2-thiouracil, 4,5-Dimethyl-2-thiouracil, 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil, 4-Amino-2-thiouracil, 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Gewicht der Schilddrüsen in Milligramm je 100 g Tier. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert der Schilddrüsengewichte von mindestens 3 Tieren. —— 2-Thiouracil; — — — — 4-Methyl-2-thiouracil; ····· 4-Propyl-2-thiouracil; —·—·— 4,5-Dimethyl-2-thiouracil; - - - - - - 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil; ++++++ 4-Amino-2-thiouracil; .. .. .. 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil.

1. Verhalten der Schilddrüse.

Grundsätzliche Bedeutung kommt dem Verhalten der Schilddrüse zu, an der das 2-Thiouracil und seine Derivate primär angreifen. Das *Frischgewicht* der Schilddrüsen normaler unbehandelter Ratten, das wir zunächst an 11 Tieren ermittelten, dessen Mittelwert dann an weiteren 20 Tieren bestätigt wurde, betrug 12,7 mg/100 g Ratte. In Abb. 5 ist die Abhängigkeit der Schilddrüsengewichte von der Versuchszeit und den untersuchten Substanzen bei der Dosierung von 0,1 g/kg Ratte dargestellt. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem mittleren Gewicht der Drüsen von soviel Tieren (durchschnittlich 3—5 Ratten), wie in Tabelle 16 und 17, S. 292 293, angegeben sind. Man erkennt, daß sich die angewandten Substanzen ihrer Wirkung nach in 3 Gruppen scheiden: Die *erste Gruppe*, welche durch das 4-Methylthiouracil und das Methylisopropylthiouracil (V) gebildet wird, enthält Verbindungen, durch deren Einfluß das normale Schilddrüsengewicht maximal verdreifacht wird. Das Maximum fällt, wie bei den anderen geprüften Verbindungen,

mit dem Ende der Behandlung zusammen. Unter der Wirkung der *zweiten Gruppe* — nämlich 2-Thiouracil (I), Propylthiouracil (III) und 4,5-Dimethyl-thiouracil (IV) — wird das normale Schilddrüsengewicht nurmehr höchstens verdoppelt. Unsere Befunde bei der Behandlung mit 4-Methyl-2-thiouracil stimmen mit denen von CHAPMAN[71] sowie BAVIN und GOODCHILD[62] überein. Für Thiouracil und 4-Propyl-2-

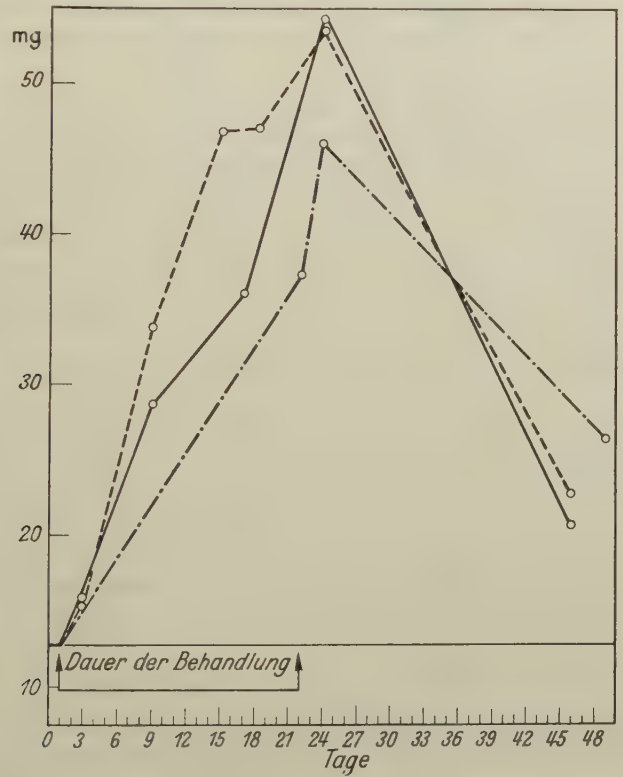


Abb. 6. Wie Abb. 5. Tägliche Einwirkung von 0,5 g 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil und 4,5-Dimethyl-2-thiouracil je Kilogramm Körpergewicht. ——— 2-Thiouracil; —·—·— 4,5-Dimethyl-2-thiouracil; — — — 4-Methyl-2-thiouracil.

thiouracil geben letztere Autoren bei ähnlicher Dosierung an Whitestar-ratten höhere Schilddrüsengewichte an als wir gefunden haben. Die Substanzen der *dritten Gruppe*, nämlich die Aminoverbindungen 4-Amino-thiouracil (VI) und 4-Amino-5-methylthiouracil (VII) erhöhen das Schilddrüsengewicht *nicht*. Gegenüber der Norm ist hier sogar eine geringe Abnahme des Gewichtes festzustellen. Dieser Befund bestätigt die Beobachtungen von ASTWOOD, BISSELL und HUGHES[5] sowie von JENSEN und KJERULF-JENSEN[7], nach denen weder 4-Amino-2-thiouracil noch 4-Methyl-2-thiocytosin (6-Amino-2-thio-pyrimidin) kropferzeugend

wirken. Der Ersatz der Methylgruppe im 4-Methylthiouracil (II) durch eine Aminogruppe [4-Amino-thiouracil (VI)] ist also mit einem Ausbleiben des kropferzeugenden Effektes verbunden. Einen ähnlichen aber schwächeren Effekt beobachtet man, wenn die Methylgruppe statt in 4-Stellung (4-Methylthiouracil) in 5-Stellung (Thiothymin) steht[7,9]. Die Kombination von Aminierung in 4-Stellung und Methylierung in 5-Stellung bewirkt, wie wir am 4-Amino-5-methylthiouracil (VII) nachgewiesen haben, eine Verstärkung der Wirkung, die jede der beiden

Tabelle 5. *Zustandsbilder der Rattenschilddrüse bei Einwirkung von Thiouracilderivaten (Serienschnitte je einer Gruppe von 3—6 Tieren*).*

Substanz	Substanzmenge in g/kg	Mitte der Behandlungszeit	Ende der Behandlungszeit (21. Tag)	Ende der Nachperiode**
2-Thiouracil (I)	*0,5*	*aktiviert*	*sehr aktiv*	*maximal ruhig*
	0,1	schwach aktiviert	aktiviert	normal
4-Methyl-2-thiouracil (II) . . .	*0,5*	*aktiviert*	*sehr aktiv*	*maximal ruhig*
	0,1	aktiviert	stark	maximal
4-Propyl-2-thiouracil (III) . . .	0,1	—	aktiviert	ruhig
4,5-Dimethyl-2-thiouracil (IV) .	*0,5*	—	*mäßig stark aktiviert*	*normal*
	0,1	—	aktiviert	sehr ruhig
4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil (V)	0,1	—	(aktiviert)	—
4-Amino-2-thiouracil (VI) . . .	0,1	normal	normal bis ruhig	normal
4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (VII)	0,1	ruhig	ruhig	normal

* Erläuterungen zu den benutzten Begriffen vergleiche im Text.
** Bei 0,1 g/kg am 14. Tag; bei 0,5 g/kg am 24. Tag nach Behandlungsschluß.

Gruppen allein hervorbringt. Im Falle des VII kann damit das Schilddrüsengewicht unter die Norm sinken (vgl. Abb. 5). Wir führen diesen Verlust auf eine geringere Blutfülle zurück. Die Schilddrüse der Tiere, die unter dem Einfluß der Aminoverbindungen stehen, ist durchweg blasser als die der Kontrolltiere und zudem schwach verhärtet. Im Gegensatz hierzu zeigen die Drüsen von Ratten, auf die Thiouracil und die genannten Alkyl-thiouracile einwirken, sowohl eine abnorme Volumenvergrößerung als auch eine auffallend verstärkte Füllung mit Blut. Es liegen hier entsprechende Verhältnisse vor, wie sie nach dem früher Gesagten auch beim Menschen während der Behandlung mit Thiouracil, Methyl- und Propylthiouracil beobachtet werden.

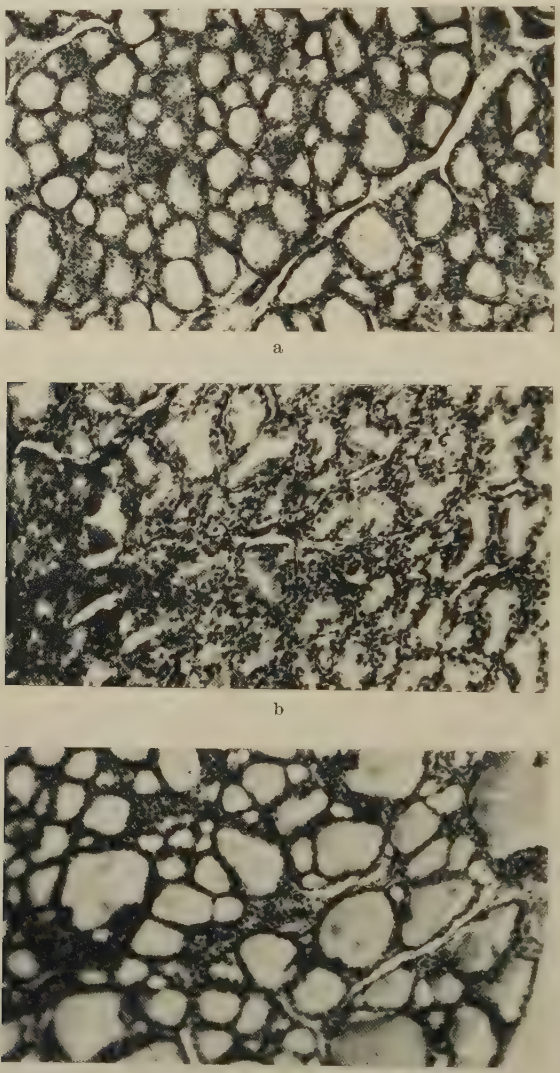
Bei Steigerung der Dosis auf 0,5 g/kg verwischen sich die Unterschiede weitgehend, welche Thiouracil, 4-Methyl- und 4,5-Dimethylthiouracil in bezug auf das Schilddrüsengewicht bei niedriger Gabe zeigen (Abb. 6; Tabelle 17, S. 292/293). Das Ausmaß der Schilddrüsenvergrößerung hat in diesen Fällen bis zum Behandlungsende noch weiter zugenommen, nämlich bis auf das 4,5fache der Norm.

Mit dem verschiedenen Verhalten des Schilddrüsengewichtes und dem verschiedenen Aussehen der Drüse geht Hand in Hand ein *histologisch unterschiedenes Bild des Organs.* Abb. 7a zeigt einen Ausschnitt aus der Schilddrüse einer normalen unbehandelten Ratte: Kubisches, einschichtiges Epithel, wenig anfärbbares Kolloid, unregelmäßig große Follikel. Dieses Normalbild wird unter der Einwirkung aller untersuchten Thiouracilderivate verändert.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht des Zustandes der Schilddrüse in der Mitte und am Ende der Behandlung mit den geprüften Substanzen sowie 14 oder 24 Tage nach ihrem Absetzen. Die histologischen Bilder während der Behandlung mit Thiouracil (I) und Methylthiouracil (II) entsprechen denjenigen, die von anderen[21, 31, 41] mit denselben Substanzen bei Ratten erhalten worden sind (Abb. 7b, stark aktivierte Drüse; Abb. 7c, maximal ruhiggestellte Drüse). Die Erhöhung des Drüsenepithels und die Abnahme des Kolloids sind bei Einwirkung hoher Dosen (0,5 g/kg) der Substanzen I und II bereits am 3. Behandlungstage, bei Einwirkung kleiner Dosen (0,1 g/kg) erst nach dem 6. Verabreichungstage deutlich erkennbar. 4,5-Dimethylthiouracil (IV) beeinflußt den Zustand der Schilddrüse weniger stark als I und II. Unter alleiniger Berücksichtigung der gefundenen Erhöhung des Schilddrüsengewichtes ergibt sich eine ähnliche relative „antithyreoidale Aktivität" der Substanz wie sie in Tabelle 1 angegeben ist. Im allgemeinen entspricht unter dem Einfluß von 2-Thiouracil und den geprüften Mono- und Dialkylthiouracilen das histologische Bild der jeweiligen Lage der Sauerstoffverbrauchswerte.

Die *Aminoverbindungen des 2-Thiouracil*, die sich schon hinsichtlich des Allgemeinzustandes des Körper- und Schilddrüsengewichtes und des eigenartigen Ablaufes der Stoffwechselsenkung von allen anderen geprüften Thiouracilderivaten unterscheiden, weichen auch im Hinblick auf das histologische Bild der Schilddrüse von jenen deutlich ab. Übereinstimmend mit dem Verhalten ihres Gewichtes wird die Schilddrüse bei Behandlung mit 4-Amino-thiouracil *nicht aktiviert*, sondern erscheint sogar *ruhiger als normal.* Nach Einwirkung von 4-Amino-5-methylthiouracil ist die Ruhigstellung noch stärker ausgeprägt: Das Epithel ist flach, die Follikel sind groß und mit viel färbbarem Kolloid gefüllt (Abb. 7d). Nach Absetzen der beiden Aminoverbindungen

sieht man bald wieder ein normales Schilddrüsenbild (Abb. 7e). Das Ausbleiben der in der Schilddrüse anatomisch nachweisbaren Zeichen



a

b

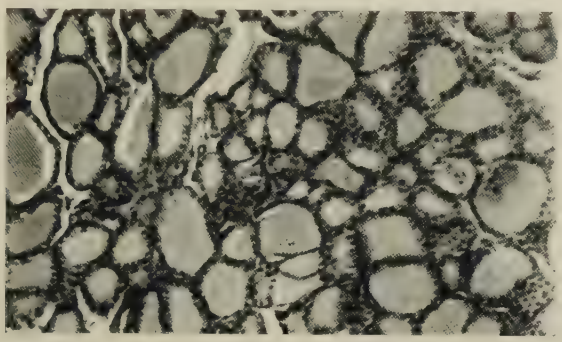
c

Abb. 7 a—c.

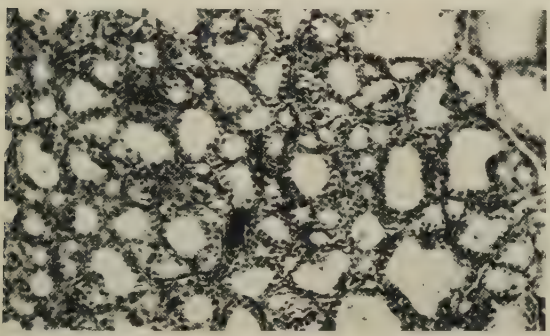
der Gegenregulation des Hypophysenvorderlappens deutet ebenso wie die fehlende Vergrößerung der Thyreoidea, die allen bisher geprüften Amino-mercapto-pyrimidinen, unabhängig von der Stellung der Amino-

gruppe, gemeinsam ist, auf einen, von den einfachen Thiouracilen *unterschiedenen Wirkungsmechanismus der Aminothiouracile* hin.

Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß auch die vergleichende Prüfung von Thioharnstoffderivaten und Sulfonamiden auf einen abgewandelten Wirkungsmechanismus der letzteren hindeutet. So wird z. B. nach



d



e

Abb. 7a—e. Der Einfluß von Thiouracilderivaten auf die Struktur der Schilddrüse von Ratten. a Normale Rattenschilddrüse; b Schilddrüse einer Ratte nach 21tägiger Einwirkung von täglich 0,1 g je Kilogramm Körpergewicht 4-Methylthiouracil per os; c Schilddrüse einer Ratte, die 21 Tage täglich 0,1 g je Kilogramm Körpergewicht 4-Methylthiouracil erhalten hatte und am 14. Tage nach Beendigung der Behandlung getötet wurde; d Schilddrüse einer Ratte nach 21tägiger Einwirkung von täglich 0,1 g je Kilogramm Körpergewicht 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil per os; e Schilddrüse einer Ratte, die 21 Tage täglich 0,1 g je Kilogramm Körpergewicht 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil erhalten hatte und am 14. Tage nach Beendigung der Behandlung getötet wurde. Färbung: Hämalaun-Eosin. Vergrößerung etwa 80fach.

de Robertis und Gonzalois[72] das Oxydations-Reduktionspotential, das in den Zellen und dem Kolloid der aktivierten Drüse übereinstimmend + 0,050 Volt beträgt, durch Thioharnstoff gleichartig auf — 0,20 Volt erniedrigt, während Sulfanilamid das Potential der Schilddrüsenzellen nicht beeinflußt. Ferner reagiert Tyrosin viel schneller mit Jod als die Sulfonamide, so daß der für Thiouracil angenommene Mechanismus der direkten Abfangung des Jods hier keine Gültigkeit hat[28].

Wir halten es für denkbar, daß die nähere Prüfung des von den üblichen Thiouracilen abweichenden Verhaltens der Aminothiouracile (Senkung des Sauerstoffverbrauches bei gleichzeitiger Ruhigstellung der Schilddrüse) Beziehungen zum thyreotropen Hormon der Hypophyse aufdecken wird. Da das histologische Bild der Hypophyse, wie im folgenden beschrieben ist, nicht von dem abweicht, das unter der Wirkung von Thiouracil und dessen geprüften Alkylderivaten entsteht, dürfte der Angriffspunkt der Aminoverbindungen vermutlich nicht in der Hypophyse selbst liegen. Sie müßten vielmehr als Antagonisten des thyreotropen Hormones wirken oder aber dessen Angriffspunkt in der Schilddrüse blockieren.

2. Verhalten anderer Organe.

Hypophyse. Die Hypophysenvorderlappen der mit Thiouracil, Methyl-thiouracil und den beiden Aminothiouracilen VI und VII behandelten Ratten zeigen, als Ausdruck der Regulation gegen die Blockierung der Schilddrüse, eine mehr oder weniger große Zunahme der basophilen Zellen. Nach Absetzen der Substanzen tritt Rückbildung zur Norm ein; es überwiegen dann die eosinophilen Zellen. 4-Propyl-2-thiouracil und in abgeschwächtem Maße 4,5-Dimethyl-2-thiouracil bewirken das Auftreten vieler Zellen mit aufgelockertem Protoplasma. verwaschenen Zellgrenzen und Sekrettröpfchen. Ein ähnliches histologisches Bild beobachtete Hölscher[51] nach Verabreichung des Natriumsalzes vom 4-Methyl-2-thiouracil. In der Nachperiode klingen die Veränderungen wieder ab.

Die sonst bei Mangel an Schilddrüsenhormon beobachtete stärkere Hypertrophie der Hypophyse fehlte. Die Frischgewichte lagen mit 3,1—6,9 mg/100 g Tier im Bereich der Norm (vgl. Tabelle 16 und 17, S. 292/293).

Nieren. Bei Ratten, denen 0,5 g Methylthiouracil (II) je Kilogramm und Tag verabreicht worden waren, zeigten die Nieren in beinahe 50% der Fälle eine starke grauweiße Sprenkelung. Etwas schwächer und weniger häufig traten dieselben Erscheinungen nach gleichen Mengen von Thiouracil auf. Histologisch fanden sich in beiden Fällen schollige geschichtete Ablagerungen in den Harnkanälchen, vorwiegend in den Schleifenschenkeln. Der Befund erinnerte an das Bild einer verkalkenden Nephrose. Während Zellinfiltrate fehlten und Blut- oder Eiweißzylinder in den Harnkanälchen nicht nachweisbar waren, sah man im Bereich der Ablagerungen hin und wieder kleine Narben. Bei 0,1 g I oder II je Kilogramm Tier traten die beschriebenen Erscheinungen in den Nieren ebensowenig auf wie nach Verabfolgung gleicher Mengen von den anderen genannten Thiouracilderivaten.

Die Frage, ob die beobachteten Nierenveränderungen die unmittelbaren Folgen der durch die Harnwege ausgeschiedenen, in schwachsaurem Medium recht schwer löslichen Substanzen oder ihrer Abbauprodukte sind, muß zunächst offen bleiben. Es wäre auch denkbar, daß die Ursache des pathologischen Befundes eine Stoffwechseländerung ist. Immerhin erklären die Nierenveränderungen das gelegentliche Auftreten von Eiweiß und Blut im Harn und haben sicher auch teil an der hohen Letalität durch die beiden Substanzen Thiouracil und Methylthiouracil.

Die *Nebennieren* wiesen in keinem Falle pathologische Veränderungen auf. Ihre Gewichte waren normal (Tabelle 16 und 17, S. 292/293).

Die *Leber* der behandelten Tiere zeigte stets eine Vermehrung des periportalen Bindegewebes, die vermutlich Ausdruck einer vermehrten resorptiven Leistung des Organs ist. Bei 2 Tieren wurden als Zufallsbefund kleine Rundzelleninfiltrate gefunden (Infektion). Fettige Degenerationen oder ausgedehnte Nekrosen kamen nicht vor.

Über das Verhalten der *Ovarien* wurde von Kopf, Loeser und Meyer[73] bereits berichtet. Untersuchte *Hoden* waren ohne Besonderheiten.

Wie Fischer, Kopf und Loeser[74] gefunden haben, läßt das *Blutbild* der Ratten unter der Wirkung von 0,5 g 2-Thiouracil bzw. 4-Methylthiouracil je Kilogramm Tier und Tag eine Abnahme der Zahl der Leukozyten und das Auftreten unreifer myeloischer Zellformen erkennen. Noch während oder erst nach der Behandlung setzt ferner eine Kernverschiebung ein. Bei niedriger Dosierung (0,1 g/kg) wird nur gelegentlich eine Leukopenie beobachtet. Die in Angriff genommene Prüfung des Blutbildes von Tieren, die unter der Wirkung der Aminothiouracile VI und VII stehen, hat bisher bei Anwendung von 0,1 g/kg Tier und Tag keine Abweichungen in der Zahl der Leukozyten gegenüber der Norm ergeben.

Für die Durchsicht der histologischen Präparate möchten wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Siegmund, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Münster i. Westf. und Herrn Prof. Dr. Giese, Pathologisches Institut der Städtischen Krankenanstalten Bremen, danken.

Zusammenfassung.

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen pharmakologischer Wirkung und chemischer Konstitution von 2-Thiouracil und 2-Thiouracilderivaten ergeben, daß 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil, 4-Propyl-2-thiouracil, 4,5-Dimethyl-2-thiouracil, 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil, 4-Amino-2-thiouracil und 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil bei 22tägiger Zufuhr von 0,1 g/kg und Tag den *Stoffwechsel* von Ratten senken. Diese Senkung ist reversibel. Die Stoffwechselwirkung ist quantitativ gleich, denn das Maximum der Abnahme liegt bei allen untersuchten Derivaten des 2-Thiouracil bei 30%. Qualitativ zeigen sich Unterschiede, die abhängig sind von der Art, der Zahl und der Stellung der Substituenten.

Bei Einwirkung der *Mono-alkylverbindungen* ist der Abfall des Stoffwechsels steil. Er erreicht sein Minimum in der Mitte der Behandlungszeit und erfährt nach dem Absetzen der Substanzen eine kurz anhaltende starke Steigerung über die Norm.

Die *Dialkylderivate* verursachen eine durch wiederholte Anstiege unterbrochene Abnahme der Sauerstoffverbrauchswerte. Ihr tiefster Punkt fällt mit dem Ende der Behandlung zusammen. Die Rückkehr zu normalen Werten erfolgt langsam und ohne Überschreiten der Norm.

Unter dem Einfluß der *Aminoabkömmlinge des 2-Thiouracil* nimmt der Sauerstoffverbrauch treppenförmig ab. Der Tiefpunkt der Abnahme liegt hier in der ersten Woche nach dem Abschluß der Behandlung. Ihm folgt ein gleichmäßiger Anstieg zur Norm.

In ihrer Wirkung auf das *Körpergewicht* lassen sich die obengenannten Abkömmlinge des 2-Thiouracil in 2 Gruppen einteilen. Die erste umfaßt die Alkyl-, die zweite die Aminoderivate. Während die Zunahme des Körpergewichtes unter der Einwirkung der Alkylderivate im Vergleich zu dem normaler Tiere gehemmt wird, haben die Aminoverbindungen keinen hemmenden Einfluß auf das Körpergewicht.

Das histologische Bild der Schilddrüse wird übereinstimmend mit den Befunden anderer Autoren durch die genannten Alkylderivate gleichsinnig mehr oder weniger stark im Sinne einer Aktivierung, die als Ausdruck einer Gegenregulation gedeutet wird, verändert. In gleicher Weise wie die Stoffwechselwirkung und das Körpergewicht werden auch die Veränderungen in der Schilddrüse durch die Art, die Zahl und die Stellung der Substituenten im Molekül des 2-Thiouracil bestimmt. Diese Abhängigkeit gibt sich besonders in der Größenzunahme der Schilddrüse zu erkennen: Unter der Wirkung von 4-Methyl-2-thiouracil und 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil fanden wir das Gewicht der Schilddrüse verdreifacht, unter dem Einfluß von 4-Propyl-2-thiouracil, 4,5-Dimethyl-2-thiouracil verdoppelt. Das Maximum der Zunahmen fällt dabei mit dem Ende der Behandlungszeit zusammen.

4-Amino-2-thiouracil und 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil bewirken *keine Gewichtszunahme* der Schilddrüse. Die kropferzeugende Wirkung wird also bei Ersatz der Methylgruppe im 4-Methyl-2-thiouracil durch eine Aminogruppe verhindert. Kombination von Aminierung in 4-Stellung und Methylierung in 5-Stellung führt zu einer Verkleinerung der Schilddrüse. Den Einfluß der Methylierung in 5-Stellung zeigt schon das 4,5-Dimethyl-2-thiouracil, dessen kropferzeugende Wirkung gegenüber der des 4-Methyl-2-thiouracil herabgesetzt ist. Die Einführung einer 5-ständigen Isopropylgruppe ändert den gewichtssteigernden Effekt des 4-Methylthiouracil nicht.

In Übereinstimmung mit dem Verhalten des Gewichtes wird die Schilddrüse bei Behandlung mit 4-Amino-2-thiouracil *nicht aktiviert*, sondern erscheint ruhiger als normal. Diese Ruhigstellung ist bei Einwirkung von 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil durch die zusätzliche Wirkung des 5-ständigen Methyl besonders ausgeprägt.

Es scheint Proportionalität zu bestehen zwischen dem Ausmaß der durch die einzelnen Verbindungen bewirkten Schilddrüsenvergrößerung und der Häufigkeit der beobachteten *Nebenwirkungen* (Lähmungen, Veränderungen der Speicheldrüsen und des weißen Blutbildes, erhöhte Sterblichkeit).

2-Thiouracil und dessen untersuchte Derivate verursachen bei 22tägiger Einwirkung von täglich 0,1 g/kg Ratte keine pathologischen *Organveränderungen*. Unter der Wirkung von 0,5 g 2-Thiouracil oder 4-Methyl-2-thiouracil je Kilogramm Tier zeigen die Nieren schollige geschichtete Ablagerungen in den Harnkanälchen. Der Befund erinnert an das Bild einer verkalkenden Nephrose.

Der Befund, daß das bei alleiniger Untersuchung der Schilddrüse als „antithyreoidal" unwirksam beschriebene 4-Amino-2-thiouracil ebenso wie dessen 5-Methylderivat stark stoffwechselsenkend wirkt, weist auf die Bedeutung einer kombinierten Untersuchung von Schilddrüse und Gesamtstoffwechsel bei der Prüfung derartiger Substanzen hin.

Anhang.

Tabellen und Literatur.

Literatur.

[1] Mackenzie, J. B., C. G. Mackenzie and E. V. McCollum: Science N.Y. **94**, 518 (1941). — Mackenzie, J. B., and C. G. Mackenzie: Federation Proc. **1**, 122 (1942). — [2] Mackenzie, C. G., and J. B. Mackenzie: Endocrinology (Am.) **32**, 185 (1943). — [3] Astwood, E. B.: J. Pharmacol. (Am.) **78**, 79 (1943). — Harvey Lectures. Lancaster: Science Press 1945. — [4] Astwood, E. B., J. Sullivan, A. Bissell and R. Tyslowitz: Endocrinology (Am.) **32**, 210 (1943). — [5] Astwood, E. B., and A. Bissell: Endocrinology (Am.) **34**, 282 (1944). — Astwood, E. B., A. Bissell and A. M. Hughes: Endocrinology (Am.) **37**, 456 (1945). — [6] Roblin, R. O. jr.: Chem. Rev. **38**, 255 (1946). — [7] Jensen, K. A., u. K. Kjerulf-Jensen: Acta pharmacol. Toxicol. **1**, 280 (1945). — [8] Wilson, C. O., J. H. Boothe and J. M. Dille: Science N.Y. **104**, 100 (1946). — Perrault, M., and O. Bovet: Ann. Endocrinol. **6**, 86 (1945). — Rodriguez-Perez, P., J. L. R. Candela y P. G. Carreras: Farmacoterap. actual. (Madrid) **4**, 12 (1947). — [9] Anderson, G. W., I. F. Halverstadt, W. H. Miller and R. O. Roblin jr.: J. amer. chem. Soc. **67**, 2197 (1945). — [10] McGinty, D. A., and W. G. Bywater: J. Pharmacol. (Am.) **84**, 342 (1945). — [11] Berman, L.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **59**, 70 (1945). — [12] Harington, C. A.: J. chem. Soc., Lond. **1944**, 193. — Proc. roy. Soc., Lond. **132**, 223 (1944). — [13] Mutzenbecher, P. v.: Z. physiol. Chem. **261**, 253 (1939). — [14] Eggert, B.: Morphologie und Histophysiologie der normalen Schilddrüse. Leipzig: Johann Ambrosius

Barth 1938. — [15] Bomskov, C.: Methodik der Hormonforschung. Bd. 1, S. 156. Leipzig: Georg Thieme 1937. — [16] Loeser, A.: Arch. exper. Path. (D.) **163**, 530 (1932). — [17] Grab, W.: Arch. exper. Path. (D.) **167**, 313, 413 (1932). — [18] Keating, F. R. jr., R. W. Rawson, W. Peacock and R. B. Evans: Endocrinology (Am.) **36**, 137 (1945). — [19] Loeser, A.: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 615. —

Tabelle 6 und 7. *Der Einfluß von 2-Thiouracil* (Tabelle 6) *und*

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm^3 je g/Std. vor der Behandlung			Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm^3 g/Std. bzw. in Prozent des mittleren 40., 42., 44. und während der Behandlung													
	I.	II.	III.		cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.	
2-Thiouracil 0,5 g/kg																		
5	1,20	1,25	1,35	1,27	1,68	132	1,81	143	1,30	102	1,49	117	1,27	100	1,18	93	1,13	89
6	1,23	1,24	1,24	1,24	1,56	126	1,40	113	1,28	103	1,13	91	0,97	78	0,83	67	0,46	38
7	1,42	1,47	1,52	1,47	1,38	94	1,45	99	1,47	100	1,34	91	1,17	80	1,37	93	1,36	93
8	1,46	1,60	1,50	1,52	1,45	95	1,37	90	1,30	86	1,10	72	1,27	84	0,98	64	1,03	68
12	1,83	2,04	1,61	1,83	1,64	90	1,49	81	1,13	62	1,14	62	1,14	62	1,13	62	1,18	64
9	1,70	1,61	1,68	1,66	1,62	98	1,21	73	1,09	66	1,27	77	1,31	79	1,29	78	1,18	71
1	1,83	2,15	1,64	1,87	1,90	102	1,72	92	1,50	80	1,49	80	1,67	89	1,31	71	1,28	68
2	1,59	1,66	1,52	1,59	1,68	106	1,53	96	1,43	90	1,34	84	0,62	39	0,89	56	0,72	45
3	1,81	1,76	1,71	1,76	1,54	88	1,45	83	1,36	77	1,39	79	1,17	66	1,21	69	1,21	69
4	1,79	2,04	1,79	1,87	1,69	90	1,49	80	1,62	87	1,24	66	1,31	70	1,21	64	1,19	64
10	1,56	1,62	1,54	1,57	2,10	134	1,63	104	1,45	92	1,30	83	1,09	69	1,32	84	1,30	83
				Mittelwert		105		96		86		82		74		73		68
4-Methyl-2-thiouracil																		
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.	
29	1,56	1,31	1,41	1,43	1,50	105	1,31	92	1,74	122	1,37	96	1,48	103	1,13	79	1,07	75
31	1,32	1,37	1,23	1,31	1,52	116	1,39	106	1,34	102	1,11	85	1,57	120	1,09	83	1,06	81
34	1,63	1,62	1,85	1,70	1,79	105	1,95	115	1,61	95	1,33	78	1,46	86	1,09	64	1,34	79
36	1,76	1,55	1,55	1,62	2,00	123	1,83	113	1,48	92	1,19	73	1,25	77	1,17	72	1,21	75
32	1,47	1,61	1,53	1,54	1,65	107	1,75	114	1,48	96	1,31	85	1,42	92	1,19	77	1,29	84
25	1,45	1,55	1,47	1,49	1,54	103	1,52	102	1,30	87	0,95	66	1,23	83	1,12	75	0,91	61
26	1,52	1,59	1,56	1,56	1,32	85	1,53	98	1,46	94	1,52	97	1,26	81	0,70	45	1,05	66
27	1,43	1,92	1,72	1,69	1,91	113	1,48	88	1,51	89	1,17	69	1,26	75	1,14	67	0,95	56
28	1,40	2,02	2,11	1,84	1,89	103	1,64	89	1,34	73	1,35	73	1,74	95	1,31	71	0,70	38
30	1,50	1,33	1,55	1,46	1,70	116	1,46	100	1,75	120	1,35	92	1,40	96	1,10	75	0,76	52
33	1,58	1,61	1,86	1,68	1,70	101	1,54	92	1,64	98	1,23	73	1,31	78				
35	1,44	1,44	1,65	1,51	1,43	95	1,39	92	1,39	92								
				Mittelwert		106		100		97		81		90		71		67

[20] Rawson, R. W., J. F. Tannheimer and W. Peacock: Endocrinology (Am.) **34**, 245 (1944). — [21] Astwood, E. B., and A. Bissell: Endocrinology (Am.) **34**, 282 (1944). — [22] Baumann, E. J., N. Metzger and D. Marine: Endocrinology (Am.) **34**, 44 (1944). — [23] Larson, R. A., F. R. Keating jr., W. Peacock and R. W. Rawson: Endocrinology (Am.) **36**, 149, 160 (1945). — [24] Dempsey, E. W.: Endocrinology (Am.) **34**, 27 (1944). — [25] Glock, G. E.: Nature (Brit.) **154**, 460 (1944). — [26] Beinert, H., u. H. J. Bielig: Unveröffentlicht. — Vgl. auch R.

Kuhn und H. Beinert: Ber. dtsch. chem. Ges. **76**, 137 (1943). — Chem. Ber. **80**, 101 (1947). — [27] McGinty, D. A.: Zit. nach E. B. Astwood, Harvey Lectures. Lancaster: Science Press 1945. — [28] Miller, W. H., R. O. Roblin jr. and E. B. Astwood: J. amer. chem. Soc. **67**, 2201 (1944). — [29] Campbell, D., F. W. Landgrebe and T. N. Margan: Lancet **1944 II**, 630. — [30] Abelin, J.: Arch. internat.

4-Methyl-2-thiouracil (Tabelle 7) *auf den Stoffwechsel von Ratten.*

Ausgangswertes am 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 26., 27., 29., 30., 32., 33., 37., 38., 45. Tage des Versuches

	nach der Behandlung					
cm³ %	cm³ %	cm³ %	cm³ %	cm³ %	cm³ %	cm³ %
24.	26.	29.	32.	37.	40.	44.
und Tag per os.						
1,12 89	1,51 119	1,44 113	1,37 108	1,43 113	1,71 135	1,47 114
0,64 52	0,59 48	1,36 110	1,25 101	1,51 121	1,38 111	1,17 94
1,23 84	1,24 84	1,45 99	1,52 103	1,66 113	1,42 97	1,35 92
1,06 70	1,09 72	1,43 94	1,29 85	1,43 94	1,13 74	1,38 91
0,69 38	0,70 38	1,61 87	1,42 78	1,48 81	1,25 68	1,48 89
1,45 87	1,25 75	1,74 105				
1,21 64						
0,58 36						
1,13 64						
1,10 59						
64	73	101	95	104	97	96

0,5 g/kg und Tag per os.

24.	27.	30.	33.	38.	42.	45.
0,98 69	1,17 82	1,48 103	1,50 105	1,68 118	1,38 97	1,72 120
1,16 89	0,97 74	1,14 87	1,09 77	1,54 117	1,18 90	1,13 86
1,15 68	1,60 94	1,75 103	1,62 95	1,52 89	1,58 93	1,35 79
0,44 27	1,27 78	1,31 81	1,40 86	1,53 94	1,50 93	1,38 85
0,70 45	1,47 95	1,55 101	1,74 113			
1,00 67						
0,44 28						
1,06 63						
1,32 72						
0,84 58						
59	85	95	95	104	93	93

Pharmacodynam. **75**, 187 (1947). — [31] Wegelin, C.: Helvet. med. Acta **15**, 3 (1948). — [32] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Klin. Wschr. **1948**, 202. — [33] Freiesleben, E., K. Kjerulf-Jensen u. K. Schmith: Acta Pharmacol. Toxicol. **2**, 307 (1946). — [34] Williams, R. H., G. A. Kay and B. Salomon: Amer. J. med. Sci. **213**, 198 (1947). — [35] Williams, R. H.: Arch. int. Med. (Am.) **80**, 11 (1947). — [36] Bartels, E. C.: J. amer. med. Assoc. **129**, 932 (1945). — Astwood, E. B.: J. clin. Endocrinol. **5**, 345 (1945). — Lahy, F. M., and E. C.

Tabelle 8. *Der Einfluß von 2-Thiouracil auf den Stoffwechsel von Ratten* (0,1 g/kg und Tag, per os).

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm³ je g/Std. vor der Behandlung				Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm³ g/Std. bzw. in Prozent des mittleren Ausgangswertes am 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33. und 36. Tage des Versuches																	
						während der Behandlung												nach der Behandlung									
	I.	II.	III.	IV.		cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%
						3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.		24.		27.		30.		33.		36.	
154	2,10	1,93	2,19	—	2,07	1,42	69	1,99	96	1,24	59	1,39	67	1,12	54	2,22	107	2,34	117	1,01	49	1,60	77	1,14	55	1,45	70	1,14	55
155	1,87	2,02	1,98	—	1,96	2,46	126	1,83	93	2,02	103	1,85	94	1,49	76	1,62	83	3,03	155	2,18	111	1,60	82	1,33	68	1,42	72	1,10	56
157	2,03	2,19	2,00	—	2,07	2,05	100	1,79	86	1,57	76	1,72	84	1,29	62	1,57	76	1,51	73	1,56	75	1,87	90	1,57	76	1,62	78	1,35	65
158	2,14	2,01	1,88	—	2,01	1,59	79	1,46	75	1,65	82	1,59	78	1,35	67	1,60	79	1,57	78	1,65	82	1,33	66	1,86	93	1,46	73	1,33	66
480	1,83	1,74	1,62	2,05	1,81	1,75	96	1,21	67	1,40	77	1,37	76	1,69	93	1,41	78	1,47	81	1,36	75	1,58	87	1,20	66	1,43	79	1,25	69
481	1,96	1,57	1,63	1,97	1,78	1,50	84	1,44	81	1,95	109	1,83	103	1,56	88	1,54	86	1,55	87	1,54	86	1,69	95	1,39	78	1,56	87	1,05	59
482	1,67	1,68	1,34	1,62	1,58	1,32	84	1,25	80	1,28	82	2,01	128	1,28	102	1,24	82	1,45	92	1,73	110	1,25	79	1,11	71	1,08	69	1,03	66
483	1,43	1,68	1,43	1,62	1,54	1,26	82	1,28	83	1,23	80	1,49	97	1,23	80	1,20	78	1,22	79	1,12	72	1,26	82	1,20	78	1,10	72	1,29	84
159	2,07	2,16	1,96	—	2,06	2,26	110	1,72	83	1,66	81	2,05	99	1,58	77	2,04	99	2,16	105	1,88	91								
160	1,94	1,78	1,77	—	1,83	2,05	112	1,81	99	1,46	79	1,45	79	1,83	100	1,68	90	2,30	126	1,44	78								
161	1,94	1,73	1,99	—	1,89	1,61	85	1,81	96	1,59	84	1,93	102	1,75	93	1,55	82	2,23	123	1,48	78								
476	1,32	1,65	1,40	1,08	1,36	2,31	166	1,29	95	1,29	95	1,54	113	1,50	110	1,15	85	1,03	76	1,40	102								
477	1,22	1,72	1,50	1,70	1,54	1,28	83	1,23	80	1,31	85	1,69	109	1,14	74	1,53	99	1,19	77	1,74	113								
478	1,47	1,89	1,44	1,28	1,52	1,40	90	1,09	72	1,46	96	1,79	118	1,15	75	1,24	81	1,64	108	1,50	99								
479	1,36	2,02	1,47	1,35	1,55	1,40	90	1,34	86	0,99	64	2,00	129	0,99	64	1,23	79	0,95	62	1,24	80								
472	1,18	1,51	1,41	1,61	1,43	1,54	108	1,25	88	1,09	76	1,14	80	1,29	90	1,29	90	0,95	66										
474	1,41	1,45	1,46	1,35	1,42	1,42	100	1,42	100	1,45	102	1,51	107	1,14	80	1,39	98	1,23	87										
475	1,57	1,69	1,46	1,35	1,52	1,52	100	1,46	96	1,37	90	1,01	67	1,20	79	1,41	95	1,23	81										
139	2,34	2,13	1,92	—	2,13	1,80	85	1,85	87	1,69	79	1,44	68	1,56	73	1,52	72												
140	1,87	2,18	1,97	—	2,01	1,76	88	1,64	82	1,60	70	1,66	83	1,48	74	1,68	84												
141	2,29	1,88	1,73	—	1,97	1,81	92	1,78	90	1,46	74	1,48	76	1,69	86	1,61	82												
142	2,17	2,03	1,90	—	2,03	2,11	104	1,98	98	1,65	81	1,78	88	1,48	73	1,53	75												
156	1,88	1,83	2,15	—	1,95	1,74	89	0,94	48	1,58	81	1,61	82	1,15	59														
473	1,47	1,73	1,39	1,70	1,57	1,48	94	1,18	75																				
				Mittelwert			97		85		83		92		80		85		93		87		82		73		75		65

Tabelle 9 und 10. *Der Einfluß von 4-Methyl-2-thiouracil* (Tabelle 9) *und 4-Propyl-2-thiouracil* (Tabelle 10) *auf den Stoffwechsel von Ratten.*

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm^3 je g/Std. vor der Behandlung			Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm^3 g/Std. bzw. in Prozent des mittleren Ausgangswertes am 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33. und 36. Tage des Versuches															
					während der Behandlung								nach der Behandlung							
	I.	II.	III.		cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.		24.	
4-Methyl-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.																				
60	1,30	1,43	1,62	1,48	1,63	110	1,30	88	1,32	89	1,13	76	1,21	82	1,41	95	1,31	88	1,29	87
61	1,49	1,47	1,90	1,58	1,28	81	1,10	69	1,40	88	0,62	39	0,43	27	1,09	69	1,15	73	1,37	87
62	1,27	1,89	1,92	1,63	1,40	86	1,31	80	1,43	88	1,20	74	1,08	67	1,18	72	1,10	67	1,25	77
63	1,20	1,15	1,41	1,27	1,35	106	1,19	94	1,14	89	1,06	83	1,45	114	1,28	101	1,05	83	1,33	105
64	1,45	1,35	1,30	1,36	1,17	86	1,26	93	1,16	85	1,02	75	1,03	75	1,04	76	1,19	88	1,10	81
65	1,38	1,32	1,25	1,33	1,26	95	1,16	87	0,90	68	1,37	103	1,27	95	1,06	84	1,34	101	1,32	99
66	1,51	1,51	1,58	1,53	1,40	94	1,12	75	1,25	83	1,21	81	0,95	64	1,16	78	1,33	89		
67	1,26	1,66	1,30	1,38	1,30	93	1,42	103	1,23	89	0,88	64	1,25	91	1,14	75	1,25	90		
69	1,27	1,28	1,35	1,29	1,18	91	1,27	98	0,50	39	0,99	77	0,98	76	1,00	77	1,15	89		
70	1,53	1,46	1,57	1,56	1,29	83	1,49	96	1,17	75	0,71	46	1,13	72	1,04	67	1,17	75		
68	1,39	1,45	1,53	1,45	1,53	106	1,32	91	1,42	98										
71	1,31	1,30	1,37	1,33	1,32	99	1,39	105												
				Mittelwert	94		90		81		72		77		79		84		89	
4-Propyl-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.																				
604	1,31	1,29	1,41	1,34	1,50	140	1,44	108	1,09	82	0,97	73	1,01	76			0,94	71	1,01	76
605	1,91	1,77	1,46	1,72	1,49	87	1,55	90	1,27	74	1,60	94	1,06	62	1,79	75	1,39	81	1,22	71
607	1,53	1,45	1,71	1,56	1,37	88	1,26	81	1,36	87	1,35	86	1,14	73	1,03	66	1,35	86	1,29	83
606	1,59	1,30	1,29	1,40	1,18	85	1,36	98	1,13	81	1,06	76	1,04	74	0,95	68	1,24	89	0,92	66
601	1,48	1,27	1,54	1,43	1,39	97	1,18	83	0,97	68	0,99	70	0,79	55	1,27	89	0,97	68		
602	1,52	1,24	1,40	1,39	1,59	115	1,55	112	1,04	75	1,17	84	1,18	86	1,04	75	0,86	62		
603	1,48	1,30	1,52	1,43	1,69	118	1,44	100	1,18	82	1,13	79	1,14	79	1,22	78	1,07	75		
608	1,64	1,71	1,32	1,56	1,22	79	1,30	84	1,07	69	1,11	71	0,95	61	1,02	66	1,61	65		
				Mittelwert	101		95		77		79		71		74		74		74	

Tier Nr.	nach der Behandlung									
	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
	27.		30.		33.		36.			
4-Methyl-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.										
60	1,77	120	1,56	105	1,66	112	1,39	94		
61	1,90	120	1,76	111	1,89	119	1,34	85		
62	1,79	109	1,37	84	1,29	79	1,21	74		
63	1,70	134	1,40	110	1,13	89	1,29	102		
64	1,59	117	1,43	105	1,27	93	1,31	96		
65	1,70	128	1,44	108	1,47	111	1,29	97		
66										
67										
69										
70										
68										
71										
	121		104		101		91			
4-Propyl-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.										
604	0,97	73	1,45	109	1,88	141	1,04	78		
605	1,27	74	1,51	88	1,58	92	1,37	80		
607	1,05	65	1,38	88	1,72	110	1,28	82		
606										
601										
602										
603										
608										
	71		95		114		80			

Bartels: Animal Surgery **125**, 572 (1947). — [37] Astwood, E. B., and W. P. van der Laan: J. clin. Endocrinol. **5**, 524 (1945). — [38] Wilson, A., and J. Goodwin: Lancet **1947**, 669. — [39] McCullagh, E. P., R. E. Hibbs and R. W. Schneider: Amer. J. med. Sci. **214**, 545 (1947). — [40] Cookson, H.: Lancet **1945**, 249. — [41] Hadorn, W., u. K. Baer: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 1. — [42] Spühler, O.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 275. — [43] Rawson, R. W., F. D.

Tabelle 11 und 12. *Der Einfluß von 4,5-Dimethyl-2-thiouracil* (0,5 g/kg

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm^3 je g/Std. vor der Behandlung			Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm^3 g/Std. bzw. in Prozent des 39., 42., 45. und 48. während der Behandlung											
	I.	II.	III.		cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.	
																	4,5-Dimethyl-2-thiouracil	
97	1,34	1,29	1,44	1,36	1,32	97	1,24	91	1,26	93	1,27	93	1,21	89	1,06	78	1,44	105
98	1,50	1,67	1,68	1,58	1,49	94	0,67	42	0,65	41	0,65	41	1,10	69	1,09	69	0,93	59
99	1,78	1,50	1,52	1,55	1,21	78	1,21	78	1,33	86	1,09	70	1,23	79	1,04	69	1,17	75
100	1,54	1,45	1,54	1,49	1,27	85	1,20	81	1,26	84	1,21	81	1,10	74	1,06	71	1,12	75
101	2,04	1,80	1,44	1,67	1,68	101	1,49	89	1,41	85	1,44	86	1,30	79	1,24	74	1,36	81
104	1,75	1,56	1,41	1,46	1,22	84	1,51	103	1,24	85	1,27	87	1,27	87	1,15	79	1,04	71
102	1,76	1,43	1,97	1,65	1,44	87	0,89	54	0,76	46	0,68	41	1,33	81	1,09	66	1,19	72
103	1,68	1,33	1,64	1,50	1,20	80	1,35	90	1,37	91	1,08	72	1,21	81	1,00	67	1,14	76
105	1,36	1,28	1,44	1,35	1,36	101	1,29	96	1,11	82	1,14	84	1,21	89	1,23	91	1,36	101
107	1,68	1,98	1,40	1,63	1,33	82	1,20	74	1,28	78	1,19	73	1,32	81	1,07	66	0,97	60
108	1,33	1,26	1,41	1,30	1,48	114	1,38	106	1,23	95	1,14	88	1,31	101	1,06	86	1,15	88
106	1,48	1,63	1,39	1,50	1,77	118	1,38	92	0,78	52	0,53	35	1,24	83				
				Mittelwert		93		83		76		71		83		74		79
																	4,5-Dimethyl-2-thiouracil	
630	1,66	1,87	1,82	1,78	1,55	87	1,38	77	1,19	67	1,37	77	1,47	83	1,29	72	1,10	61
631	1,73	1,96	1,56	1,75	1,35	77	1,72	98	1,07	61	1,26	72	1,35	77	1,32	89	1,13	65
632	1,44	2,00	1,76	1,73	1,74	100	1,71	99	1,47	85	1,44	83	1,52	87	1,42	82	1,11	64
629	1,85	1,47	1,98	1,77	1,37	78	2,01	114	1,61	91	1,62	92	1,25	71	1,35	77	1,53	87
625	1,65	1,36	1,44	1,48	1,50	101	1,04	70	1,21	81	1,84	124	1,34	91	1,34	91	1,38	93
626	1,38	1,40	1,60	1,46	1,33	91	1,09	75	1,05	72	1,52	109	1,32	91	1,20	82	1,07	74
627	1,62	1,41	1,55	1,53	1,64	107	1,08	71	1,09	72	1,03	68	1,18	77	1,23	80	0,96	63
628	1,82	1,59	1,60	1,66	1,48	87	1,00	59	1,13	68	1,18	71	1,36	82	1,25	75	1,04	62
				Mittelwert		91		83		75		87		82		81		71

Moore, W. Peacock, J. H. Means, O. Cope and C. R. Riddle: J. clin. Invest. (Am.) **24**, 869 (1945). — [44] van Winkle, W. jr., S. M. Hardy, G. R. Hazel, D. C. Hines u. a.: J. amer. med. Assoc. **130**, 343 (1946). — [45] Moore, F. D.: J. amer. med. Assoc. **130**, 6 (1946). — [46] Fischer, L., R. Kopf u. A. Loeser: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **205**, 730 (1948). — [47] Moore, F. D., D. N. Sweany, O. Cope, R. W. Rawson and J. H. Means: Ann. Surg. **120**, 152 (1944). — [48] F. Hüter: Z. Naturforsch. **1**, 283 (1946). — [49] Studer, A.: Experientia **4**, 232 (1948). — [50] Glock, G. E.: Brit. J. Pharmacol. Chemother. **1**, 127 (1946). [51] Hölscher, B.: Ärztl. Forsch. **1948**, 175. — [52] Wheeler, H. L., and L. M. Liddle: Amer. chem. J. **40**, 547 (1908). — [53] Wislicenus, W., u. W. Bindemann: Liebigs Ann. **316**, 27, 39 (1901). — [54] Wheeler, H. L. and McFarland: Amer. chem. J. **42**, 105 (1909). — [55] Hull, R., B. J. Lovel, H. T. Openshaw, L. C.

Payman and A. R. Todd: J. chem. Soc., Lond. **1946**, 357. — [56] Nef, I. U.: Liebigs Ann. **309**, 187 (1900). — [57] Rupe, H., u. C. Courvoisier: Helvet. chem. Acta **6**, 1061 (1923). — [58] Traube, W.: Liebigs Ann. **331**, 716 (1903). — [59] Bone and Perkin: J. chem. Soc., Lond. **67**, 421 (1890). — [60] Hessler, C.: J. amer. chem. Soc. **35**, 990 (1913). — [61] Loeser, A., A. Ruland u. V. M. Trikojus: Arch. exper. Path. (D.) **189**, 664 (1938). — [62] Bavin, E. M., and D. A. Goodchild:

Tabelle 11 und 0,1 g/kg Tabelle 12) *auf den Stoffwechsel von Ratten.*

mittleren Ausgangswertes am 3., 6.,9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33., 36., Tag des Versuches

nach der Behandlung																
cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%	cm³	%
24.		27.		30.		33.		36.		39.		42.		45.		48.	
0,5 g/kg und Tag per os.																	
1,05	77	1,08	84	1,47	108	1,20	88	1,41	104	0,94	69	1,23	90	1,31	96	1,08	79
1,13	72	1,38	87	1,40	89	1,59	101	0,93	59	1,18	75	1,56	99	1,42	90	1,38	87
1,17	75	1,26	81	1,28	83	1,28	83	1,32	85	1,49	96	1,37	88	1,24	80	1,16	75
1,21	81	1,20	81	1,47	99	1,05	70	1,07	72	2,07	139	1,85	124	1,35	91	1,55	104
1,40	84	1,28	77	1,46	87	1,42	85	1,29	77	1,46	87	1,20	72	1,28	77	1,27	71
1,10	75	1,29	88	1,18	81	1,32	90	1,26	86	1,31	89	1,23	84	1,31	89	1,83	125
	77		83		91		85		81		93		93		87		90
0,1 g/kg und Tag per os.																	
1,43	80	1,41	79	1,53	86	1,28	71	1,69	95								
1,12	64	1,57	89	1,60	91	1,60	91	1,55	89								
1,24	72	1,92	111	1,89	109	1,60	92	1,49	86								
1,43	81	1,68	95	1,60	90												
	77		93		94		85		90								

Nature (Brit.) **157**, 659 (1946). — [63] McGavack, T. H., and M. Vogel: Endocrinology (Am.) **37**, 486 (1945). — [64] Kuhn, R., u. P. Boulanger: Z. physiol. Chem. **240**, 233 (1936). — [65] Kränzlein, P.: Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 1776 (1937). — [66] Laumey, L.: J. Physiol. et Path. gén. **30**, 364 (1932). — [67] Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser u. G. Meyer: Klin. Wschr. **1948**, 216. — [68] Bickenbach, W., M. Hess u. A. Loeser: Arch. Gynäk. **176**, 301 (1948). — [69] Kabak, J. M., A. A. Beer u. A. J. Rabkina: Bull. exper. Biol. Med. (USSR.) **21**, 37 (1946). — [70] McMillan, W. M., E. P. Reinecke, L. J. Bratzler and M. J. Francis: J. animal. Sci. **6**, 305 (1947). — [71] Chapman, C. J.: Quart. J. Pharmacy a. Pharmacol. **17**, 314 (1944). — [72] de Robertis, E., and J. M. Gonçalves: Endocrinology (Am.) **36**, 245 (1945). — [73] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Klin. Wschr. **1948**, 202. — [74] Fischer, L., R. Kopf u. A. Loeser: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **205**, 730 (1948).

Tabelle 13 und 14. *Der Einfluß von 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil* (Tabelle 13) *und 4-Amino-2-thiouracil* (Tabelle 14) *auf den Stoffwechsel von Ratten.*

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm^3 je g/Std. vor der Behandlung			Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm^3 g/Std. bzw. in Prozent des mittleren Ausgangswertes am 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33. und 36. Tage des Versuches															
					während der Behandlung										nach der Behandlung					
	I.	II.	III.		cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.		24.		27.		30.		33.		36.	
4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.																										
561	1,41	1,43	1,25	1,36	1,12	82	1,16	85	1,04	76	0,89	65	1,00	73	0,82	63	0,93	68								
563	1,49	1,64	1,47	1,53	1,27	83	1,49	97	1,30	85	1,36	89	1,19	77	1,37	89	1,12	73								
558	1,60	1,49	1,33	1,47	1,28	87	1,29	88	1,17	79	1,02	69	1,09	74	1,50	101										
559	1,34	1,24	1,29	1,29	1,16	90	1,12	87	1,08	84	1,06	82	1,06	82	1,27	99										
564	1,37	1,44	1,16	1,32	1,23	93	1,28	97	1,59	120	1,43	108	1,31	99	1,22	92										
560	2,03	1,65	1,16	1,61	1,37	85	1,67	104	1,54	95	1,06	66	1,22	75												
557	2,00	1,65	1,45	1,70	1,44	85	0,85	50																		
562	1,54	1,38	1,22	1,38	1,30	94	1,31	95																		
				Mittelwert	87		88		89		80		80		89		71									
4-Amino-2-thiouracil 0,1 g/kg und Tag per os.																										
569	1,55	1,36	1,58	1,50	1,21	81	1,45	97	1,43	95	1,19	79	1,08	72	1,22	81	1,60	107	1,06	71	1,20	80	1,11	74	1,29	86	1,37	91
571	1,76	1,71	1,76	1,74	1,38	79	1,81	104	1,48	85	1,45	84	1,25	72	1,42	82	1,23	71	0,83	48	1,31	75	1,37	78	1,27	73	1,41	81
572	1,90	1,55	1,70	1,72	1,55	90	1,81	105	1,53	90	1,56	91	1,20	71	1,19	69	1,37	79	1,15	67	1,44	84	1,34	78	1,33	77	2,06	120
570	2,06	1,53	1,60	1,73	1,24	72	1,63	94	1,47	85	1,90	110	1,57	90	1,61	91	1,93	111	1,53	89								
565	1,96	1,77	2,03	1,92	1,74	91	1,94	101	1,61	84	1,59	83	1,57	82	1,60	84	1,52	79										
568	1,43	1,17	0,91	1,17	1,34	115	1,36	116	1,15	98	1,34	114	1,20	103	1,26	108	1,24	106										
567	1,65	1,68	1,38	1,57	1,44	92	1,84	117	1,64	104	1,89	120	1,58	100	1,66	105												
566	1,79	1,34	1,17	1,43	1,24	87	1,77	124	1,49	104	1,67	117																
				Mittelwert	88		107		93		99		84		89		92		69		80		77		79		97	

Tabelle 15.

Der Einfluß von 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil auf den Stoffwechsel von Ratten (0,1 g/kg und Tag per os).

Tier Nr.	O_2-Verbrauch in cm^3 je g/Std. vor der Behandlung			Mittelwert	O_2-Verbrauch in cm^3 g/Std. bzw. in Prozent des mittleren Ausgangswertes am 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30., 33. und 36. Tage des Versuches															
					während der Behandlung										nach der Behandlung					
	I.	II.	III.		cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%	cm^3	%
					3.		6.		9.		12.		15.		18.		21.		24.		27.		30.		33.		36.	
573	1,63	1,48	1,62	1,58	0,79	50	1,32	84	1,32	84	1,42	90	1,21	77	1,22	77	1,23	78	1,11	71	1,13	72	1,49	94	1,39	88	1,36	86
574	1,57	1,42	1,48	1,49	1,13	76	1,20	81	1,58	106	1,42	96	1,19	80	1,39	94	1,21	81	1,40	94	1,15	77	1,20	80	1,60	108	1,67	112
576	1,93	1,64	1,96	1,84	0,85	46	1,90	106	1,80	98	1,53	83	1,46	79	1,59	86	1,54	84	1,02	56	1,30	71	1,27	69	1,70	92	1,74	94
575	2,34	1,69	1,70	1,91	1,46	76	1,84	96	1,77	92	1,56	82	1,66	87	1,56	82	1,49	78	1,59	83	1,39	73						
577	1,63	1,54	1,10	1,42	1,53	108	1,52	107	1,40	98	1,60	112	1,64	115	1,55	109	1,23	87										
579	2,69	2,36	1,48	2,17	1,75	80	2,07	94	2,15	129	1,52	70	2,15	129	1,70	78	1,35	62										
580	2,08	2,16	1,37	1,87	1,49	82	1,89	103	1,58	73	1,85	101	1,72	94	1,84	101	1,46	79										
578	2,00	1,68	1,33	1,67	1,86	112	1,60	96																				
				Mittelwert		80		96		97		91		94		89		78		76		73		81		96		97

Tabelle 16. *Das Verhalten des Gewichtes innersekretorischer Organe von Ratten nach Zufuhr von 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil, 4-Propyl-2-thiouracil, 4,5-Dimethyl-2-thiouracil, 4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil, 4-Amino-2-thiouracil und 4-Amino-5-methyl-2-thiouracil (per os).*

Substanz	Substanzmenge g/kg und Tag	Versuchszeit in Tagen	Dauer der Verabreichung in Tagen	Zahl der Tiere	Mittleres Gewicht der innersekretorischen Organe in mg je 100 g Tier			
					Schilddrüsen	Nebennieren	Ovarien	Hypophysen
Unbehandelte Vergleichstiere				11	12,70	27,66	38,10	4,93
2-Thiouracil	0,1	3	2	4	10,99	26,33	27,74	4,43
,,	0,1	15	14	4	20,02	34,14	45,57	4,83
,,	0,1	21	20	7	25,92	18,32	30,10	5,14
,,	0,1	24	22	3	23,77	20,15	27,93	8,14
,,	0,1	36	22	4	14,00	26,08	26,09	5,58
,,	0,1	40	22	6	13,59	27,72	31,95	5,29
4-Methyl-2-thiouracil	0,1	3	2	5	13,62	30,40	48,22	5,53
,,	0,1	9	8	5	31,60	30,29	32,64	5,44
,,	0,1	15	14	5	35,45	28,33	45,29	5,27
,,	0,1	22	21	5	41,47	23,87	36,33	5,09
,,	0,1	24	22	5	36,60	22,86	42,75	5,59
,,	0,1	37	22	10	18,75	26,67	37,80	5,74
4-Propyl-2-thiouracil	0,1	21	20	4	26,12	16,08	—	5,23
,,	0,1	36	22	3	18,01	16,94	—	4,19
4,5-Dimethyl-2-thiouracil	0,1	22	21	4	26,93	18,93	29,48	5,66
,,	0,1	36	22	4	20,17	25,87	35,39	6,99
4-Methyl-5-isopropyl-2-thiouracil	0,1	21	20	2	40,80	23,50	22,90	8,0
4-Amino-2-thiouracil	0,1	6	5	3	11,07	26,15	—	4,02
,,	0,1	9	8	4	11,24	21,23	—	4,57
,,	0,1	15	14	4	9,01	18,44	—	3,04
,,	0,1	21	20	3	14,03	39,90	33,10	4,34
,,	0,1	30	22	4	8,59	18,15	—	4,03
,,	0,1	36	22	3	9,68	28,36	29,48	4,70
4-Amino-5-methyl-2-thiouracil	0,1	6	5	4	9,68	22,13	—	3,64
	0,1	9	8	4	8,04	21,07	—	4,35
,,	0,1	15	14	4	7,58	20,66	—	3,81
,,	0,1	21	20	3	11,03	25 71	22,36	4,52
,,	0,1	30	22	4	9,05	17,75	—	3,73
,,	0,1	36	22	3	11,08	28,57	30,34	5,19

Tabelle 17. *Das Verhalten des Gewichtes innersekretorischer Organe von Ratten nach Zufuhr von 2-Thiouracil, 4-Methyl-2-thiouracil und 4,5-Dimethyl-2-thiouracil (per os).*

Substanz	Substanzmenge g/kg und Tag	Versuchszeit in Tagen	Dauer der Verabreichung in Tagen	Zahl der Tiere	Mittleres Gewicht der innersekretorischen Organe in mg je 100 g Tier			
					Schilddrüsen	Nebennieren	Ovarien	Hypophysen
Unbehandelte Vergleichstiere				11	12,70	27,66	38,10	4,93
2-Thiouracil	0,5	3	2	4	15,76	28,20	43,62	5,96
,,	0,5	9	8	4	28,83	23,46	38,11	5,85

Tabelle 17. (Fortsetzung.)

Substanz	Substanzmenge g/kg und Tag	Versuchszeit in Tagen	Dauer der Verabreichung in Tagen	Zahl der Tiere	Mittleres Gewicht der innersekretorischen Organe in mg je 100 g Tier			
					Schilddrüsen	Nebennieren	Ovarien	Hypophysen
2-Thiouracil	0,5	17	16	3	36,00	30,75	38,59	—
,,	0,5	24	22	4	54,25	23,35	44,47	5,77
,,	0,5	46	22	11	20,76	27,98	45,77	4,47
4-Methyl-2-thiouracil	0,5	3	2	5	15,20	37,71	36,72	4,59
,,	0,5	9	8	4	33,72	42,56	33,78	4,17
,,	0,5	15	14	6	46,71	36,42	22,18	5,36
,,	0,5	18	17	6	47,00	46,90	43,39	—
,,	0,5	24	22	4	53,60	41,99	43,02	5,05
,,	0,5	46	22	4	22,70	33,21	33,28	3,1
4,5-Dimethyl-2-thiouracil	0,5	22	21	4	37,26	25,43	30,67	4,82
,,	0,5	24	22	4	46,06	26,98	32,26	5,36
,,	0,5	49	22	6	26,49	29,98	38,28	6,40

Prof. Dr. Loeser, Münster i. Westf., Westring 12,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 294—300 (1949).

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Chemischen Fabrik Dr. August Wolff, Bielefeld, und den Krankenanstalten Bethel (Leitender Arzt: Prof. Dr. G. Schorsch).

Die experimentelle Bestimmung der gegen Krämpfe gerichteten Wirkung von Arzneistoffen mit Hilfe der Elektrokrampfmethode.

Von

Norbert Gerlich.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1948.)

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen[1,2], daß es mit Hilfe des Wechselstromkrampfes gelingt, experimentell die Krampferregbarkeit beim Tier zu bestimmen. Dabei dient unter bestimmten Bedingungen die geringste Wechselspannung, die bei Querdurchströmung des Kopfes von Schläfe zu Schläfe gerade eben einen generalisierten Krampf erzeugt, als Maß der Krampferregbarkeit des Zentralnervensystems (ZNS).

Wir stellten uns in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, festzustellen, ob es gelingt, mit Hilfe dieser Methode die krampferregbarkeitsherabsetzende Wirkung einiger Substanzen, z. B. narkotisch wirkender Stoffe, nachzuweisen und die Größe des Effektes in Abhängigkeit von der Dosis zu bestimmen. Weiterhin wollten wir feststellen, ob man mit Hilfe dieser Methode auch die Dauer der Wirkung und den Zeitpunkt des maximalen Effektes ermitteln kann. Gerade dieser letzte Teil der gestellten Aufgabe macht die wiederholte, z. B. $^1/_2$stündlich zu wiederholende Krampfschwellenbestimmung erforderlich. Diesem Erfordernis kann eine z. B. mit Cardiazol, Insulin, Pikrotoxin, Phenol, Coramin usw. durchgeführte Krampfschwellenbestimmung infolge der damit verbundenen zu großen Schädigung des Tieres nicht gerecht werden. Der Elektrokrampf erweist sich da als viel unschädlicher, wie wir früher bereits ausführten[2], wobei noch besonders vermerkt werden muß, daß die Krampfschwellen selbst bei wiederholten Elektrokrampfprozeduren nur unwesentlich absinken. Dies kann als Zeichen dafür gelten, daß dabei die Krampferregbarkeit des ZNS nur in geringem Maße zunimmt.

Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere dienten uns gesunde ♂ Meerschweinchen im Gewicht von 250—500 g. Die Tiere wurden in den Versuchsgruppen gewichtsmäßig

stets so verteilt, daß die zu vergleichenden Gruppen etwa das gleiche Durchschnittsgewicht aufwiesen und die Einzelgewichte nicht mehr als höchstens ± 30 g vom Durchschnittsgewicht abwichen. Das Tierfutter bestand aus Grünfutter, Steckrüben und Hafer. Während der Versuche erhielten die Meerschweinchen keine Nahrung. Wir untersuchten Chloralhydrat, Urethan, Chloreton, Luminal-Natrium und Veronal-Natrium. Chloralhydrat wurde in 20% wäßriger Lösung subkutan, Urethan ebenfalls in 20% wäßriger Lösung subkutan, Chloreton in 15% öliger (Ol. olivar.) Lösung intramuskulär, Luminal-Natrium und Veronal-Natrium als 0,5% wäßrige Lösung subkutan verabfolgt. Die 0,5%igen Lösungen von Luminal-Natrium und Veronal-Natrium wurden durch Zusatz von NaCl p. a. isoton gemacht.

Die Bestimmung der Elektrokrampfschwelle geschah nach den von uns bereits mitgeteilten Prinzipien[1,2]. Die Ausgangswerte der Krampfschwellen wurden

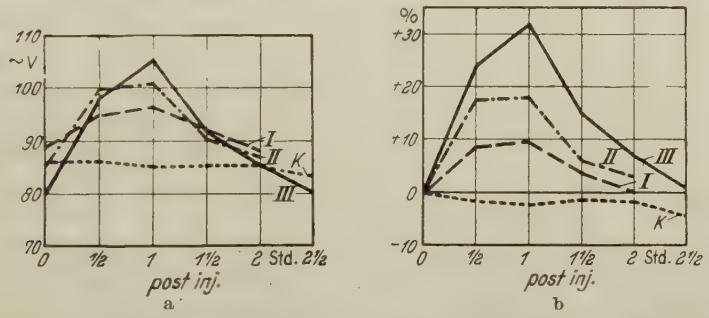


Abb. 1a u. b. Wirkung von Chloralhydrat auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale von je 6 ♂ Meerschweinchen im Durchschnittsgewicht von 488 g. I 0,1 g/kg subkutan; II 0,2 g/kg subkutan; III 0,3 g/kg subkutan. *K* 2,0 cm³ physiologische NaCl-Lösung je Kilogramm ohne Chloralhydrat. Abb. 1a zeigt die Krampfpotentiale, Abb. 1b den Prozentsatz der Wirkung.

stets $1^1/_2$ Stunden vor der Injektion der zu untersuchenden Arzneistoffe ermittelt. Nach den Injektionen erfolgte die elektrische Krampfauslösung in $^1/_2$ bzw. 1stündlichem Intervall. Der Potentiometerwiderstand der Reizapparatur betrug für alle Versuche 10000 Ω, die am Potentiometer liegende Wechselspannung 210 Volt. Die Frequenz wurde konstant auf 50,2 Hz gehalten. Die Reizzeit war immer $t = {}^{16}/_{20}$ sek. Die Anfangsreizspannung wurde bei den Versuchen mit Urethan, Chloreton, Luminal und Veronal mit 50 Volt, in dem angegebenen Chloralhydratversuch dagegen mit 70 Volt (schwerere Tiere!) gewählt. Der Potentialzuwachs belief sich von Reiz zu Reiz auf 5 Volt.

Versuchsergebnisse.

In einem ersten Versuch untersuchten wir die Wirkung verschiedener Dosen Chloralhydrat bei subkutaner Injektion auf die Elektrokrampfschwellen an männlichen Meerschweinchen. Die Abb. 1a und b geben das Ergebnis wieder.

Die Kurven zeigen, daß bereits eine Dose an Chloralhydrat, die rein äußerlich die Tiere noch nicht in ihrem allgemeinen Verhalten verändert, nämlich 0,1 g/kg, bereits eine $1^1/_2$ Stunden anhaltende Erhöhung der Krampfschwellen bewirkt. Noch ausgeprägter ist diese

Krampfschwellenerhöhung bei 0,2 und erst recht bei 0,3 g/kg, allerdings finden sich bei 0,3 g/kg bereits erhebliche Reflexstörungen. Bei einigen Tieren war die narkotische Wirkung schon so ausgeprägt, daß die Tiere in Seitenlage verharrten, wobei allerdings die Schmerzerregbarkeit einigermaßen erhalten war. Dennoch konnte aber bei allen Tieren der Elektrokrampf ausgelöst werden und trat deutlich sichtbar in Erscheinung. Die Kurven zeigen weiter, daß die Dauer der krampferregbarkeitsherabsetzenden Wirkung nicht sehr lange anhält. Das Maximum des Effektes ist bereits nach 30 Min. bzw. bei 0,3 g/kg nach 60 Min. spätestens erreicht.

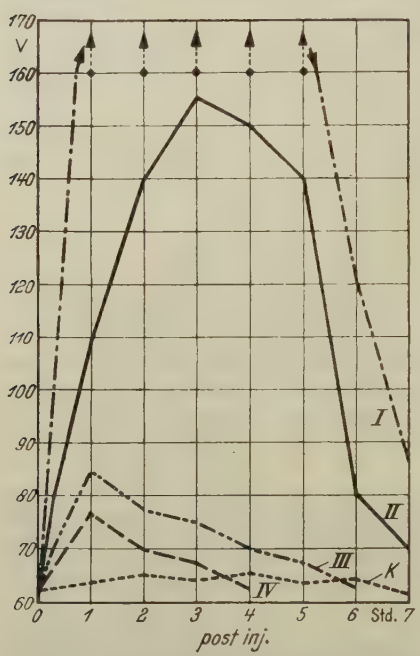


Abb. 2. Wirkung des Urethans auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale von je 6 ♂ Meerschweinchen im Durchschnittsgewicht von 318 g. I 0,87 g/kg subkutan; II 0,73 g/kg subkutan; III 0,58 g/kg subkutan; IV 0,35 g/kg subkutan. *K* Kontrollgruppe, 2,0 cm³ physiologische NaCl-Lösung/kg subkutan ohne Urethan.

Es lag nahe, zwei bewährte Tiernarkotika, Urethan und Chloreton, auf ihre krampfwidrige Wirkung zu untersuchen. Von vornherein erscheint es zwar selbstverständlich, daß beim narkotischen Effekt einer Dose auch eine Herabsetzung der Krampferregbarkeit beobachtet werden müsse. Trotz dessen wurden diese Untersuchungen aber durchgeführt. Denn es ist ja nicht ohne weiteres einzusehen, daß die narkotische Wirkung eines Arzneimittels unbedingt parallel mit seiner die Krampferregbarkeit beeinflussenden Wirkung gehen muß. Außerdem sahen wir bereits beim Chloralhydrat, daß Dosen, die rein äußerlich noch nicht den geringsten narkotischen Effekt zeigen, eine Erhöhung der Krampfschwellen verursachten. Die Abb. 2 zeigt den Einfluß verschiedener Dosen von Urethan bei subkutaner Applikation auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen, die Abb. 3 gibt die Wirkung verschiedener Dosen von Chloreton bei intramuskulärer Injektion in öliger Lösung wieder.

Aus diesen Kurven können wir entnehmen, daß wiederum kleine Dosen, die an sich noch keinen narkotischen Effekt bewirken, eine erhebliche Beeinflussung der Krampfschwellen verursachen. Weiter

können wir sehen, daß die Wirkungsdauer von der verabfolgten Dosengröße abhängt. Stärkere Dosen wirken länger und erreichen auch später ihr Wirkungsmaximum.

Im Urethanversuch unterließen wir bei den Tieren, die 0,87 g/kg erhielten, eine weitere Reiz-Spannungserhöhung über 160 Volt, da diese Tiere bereits so stark narkotisiert waren, daß ein einwandfrei beobachtbares Krampfbild nicht mehr erzeugt werden konnte. Abwehr und Schmerzreaktionen waren vollkommen aufgehoben. Bei weiterer Stromerhöhung wären sonst die zugeführten Strommengen zu groß, so daß wir eher die Tiere getötet hätten, als irgendeine Krampferscheinung zu erzwingen.

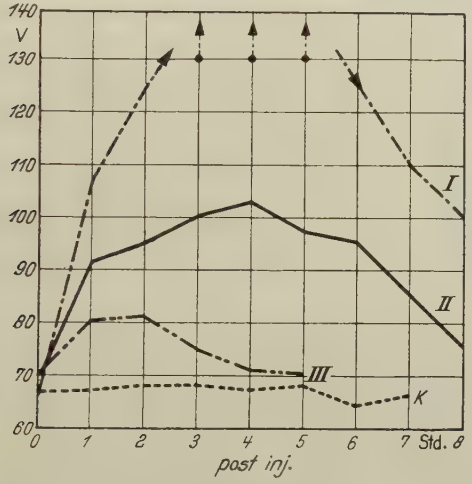


Abb. 3.

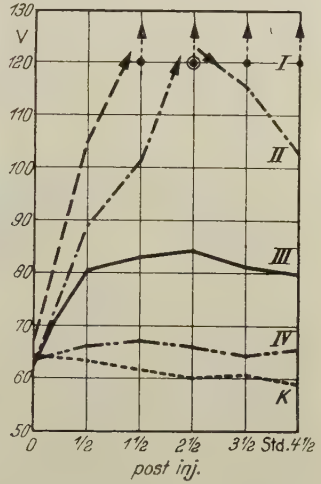


Abb. 4.

Abb. 3. Wirkung von Chloreton auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale von je 6 ♂ Meerschweinchen im Durchschnittsgewicht von 360 g. I 0,133 g/kg intramuskulär; II 0,1 g/kg intramuskulär; III 0,05 g/kg intramuskulär; *K* Kontrollgruppe, 2,0 cm³ Ol. olivar./kg intramuskulär.

Abb. 4. Wirkung von Luminal-Na. auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale von je 8 ♂ Meerschweinchen im Durchschnittsgewicht von 302 g. Gruppe III und *K* Durchschnittswerte von 24 Tieren. I 70 mg/kg subkutan; II 33,3 mg/kg subkutan; III 23,3 mg/kg subkutan; IV 13,3 mg/kg subkutan. *K* Kontrollgruppe, 3,3 cm³ physiologische NaCl-Lösung/kg subkutan ohne Luminal-Na.

Ähnlich mußten wir beim Chloretonversuch verfahren. 0,134 g/kg bewirken, allerdings erst nach der 3. Stunde, eine solche Krampfschwellenerhöhung, daß auch hierbei ein eindeutiger Krampf nicht mehr nachweisbar war. Bei solchen narkotisierten Tieren findet sich lediglich eine, für die Dauer des Stromdurchganges durch direkte elektrische Reizung erfolgende Muskelzuckung, die vornehmlich die Extensoren betrifft, seltener die Flexoren. Zur etwaigen Bestimmung der Narkosetiefe eignet sich diese Methode in der hier durchgeführten Weise also nicht.

Die Klinik interessierte begreiflicherweise besonders die Beeinflussung der Krampferregbarkeit durch Luminal und Veronal. Wir untersuchten daher die Wirkung verschiedener Dosen von Luminal-Natrium (Abb. 4) und Veronal-Natrium (Abb. 5) bei subkutaner Gabe.

Aus den wiedergegebenen Kurven können wir entnehmen, daß die Krampfschwellenerhöhung durch Luminal-Na. viel stärker ausfällt als beim Veronal-Na. Eine Steigerung der Erregbarkeit durch Veronal-Na. wurde bei keinem Tier beobachtet. Die unter den höheren Veronal-Na-Gaben stehenden Tiere machten einen viel stärker mitgenommenen Eindruck als die mit den gleichen Luminal-Na.-Dosen behandelten Meerschweinchen. Vergleicht man nun die Dosen an Luminal-Na., die die gleiche Krampfschwellenerhöhung bewirken wie die entsprechenden Veronal-Na.-Gaben, so erhält man bei prozentualer Wirksamkeitserrechnung ein Bild, wie es in Abb. 6 wiedergegeben ist.

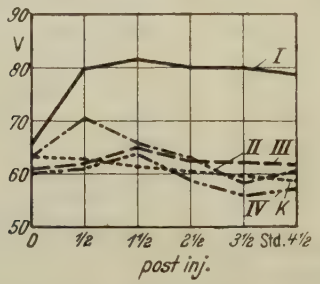


Abb. 5.

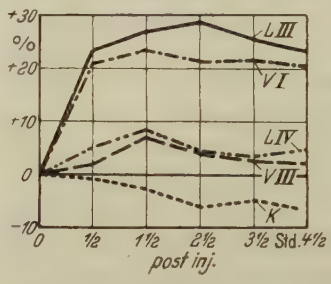


Abb. 6.

Abb. 5. Wirkung von Veronal-Na. auf die Krampfschwellen von Meerschweinchen. Durchschnittskrampfpotentiale von je 8 ♂ Meerschweinchen im Durchschnittsgewicht von 309 g. Gruppe I und *K* Durchschnittswerte von je 16 Tieren. I 70 mg/kg subkutan; II 50 mg/kg subkutan; III 33,3 mg/kg subkutan; IV 23,3 mg/kg subkutan. *K* Kontrollgruppe, 3,3 cm³ physiologische NaCl-Lösung ohne Veronal-Na.

Abb. 6. Prozentuale Wirkung gleich stark wirkender Dosen von Luminal-Na und Veronal-Na. Entsprechend Abb. 5 u. 6. L III 23,3 mg Luminal-Na./kg subkutan (Durchschnittswerte von 24 Meerschweinchen); V I 70 mg Veronal-Na./kg subkutan (Durchschnittswerte von 16 Meerschweinchen); L IV 13,3 mg Luminal-Na./kg subkutan (Durchschnittswerte von 8 Meerschweinchen); V III 33,3 mg Veronal-Na/kg subkutan (Durchschnittswerte von 8 Meerschweinchen); *K* 3,3 cm³ physiologische NaCl-Lösung/kg subkutan ohne Barbitursäure (Durchschnittswerte von 24 Meerschweinchen).

Daraus geht hervor, daß man vom Veronal-Na., um den gleichen Effekt auf die Krampferregbarkeit auszuüben, etwa 3mal so viel als vom Luminal-Na. geben muß. Es ist dies ein experimenteller Beweis für die in der Klinik bekannte Erfahrung, daß dem Luminal als symptomatisches Antiepileptikum gegenüber dem Veronal der Vorzug gewährt wird. Wir sehen aber gerade aus der letzten Abbildung, daß sich die Elektrokrampfmethode auch zur vergleichenden Bestimmung von solchen Arzneimitteln eignet, die die Krampferregbarkeit herabsetzen.

Bis jetzt beschrieben wir lediglich die Beeinflussung der Krampfschwellen durch bestimmte, die Krampferregbarkeit herabsetzende Arzneistoffe. Wir beobachteten aber durchwegs bei allen hier wiedergegebenen Untersuchungen, daß sich mit der Zunahme der Krampfschwellen, also der Vergrößerung der gegen Krämpfe gerichteten Wirkung, auch der Charakter des Krampfbildes änderte und umgekehrt auch bei abklingender Wirkung.

Der normale Elektrokrampf zeigt ja, wie wir früher[2] bereits ausführten, mehrere gut unterscheidbare Stadien:

Generalisierter Spasmus für die Dauer des Stromdurchganges, tonische Krampfphase, klonische Phase und erregungsloser Zustand. Wird die Krampfschwelle durch solche narkotisch wirkende Substanzen, wie wir sie in dieser Arbeit untersuchten, heraufgesetzt, so verschwinden zunächst die klonischen Krämpfe. Nimmt die Wirkung weiter zu, so lassen auch die tonischen Krämpfe an Intensität nach, um schließlich im narkotischen Zustand ganz aufzuhören. Das ist auch der Zeitpunkt, wo eine eindeutige Krampfschwellenbestimmung nicht mehr möglich ist, denn die Hauptkriterien des Krampfes, nämlich die tonische und die klonische Phase, fehlen. Läßt die Wirkung nach, so beobachtet man regelmäßig zunächst das Wiederauftreten von tonischen Krämpfen, hernach kehren endlich auch bei weiterem Sinken der Krampfschwellen die klonischen Krampfbilder zurück. Diese Erscheinungen waren uns deswegen so auffällig, weil sie regelmäßig bei allen Tieren beobachtet wurden. Interessanterweise trat diese Erscheinung auch beim Luminal-Na. genau so deutlich auf wie etwa beim Urethan,während bei Veronal-Na. vorwiegend eine Abschwächung der klonischen Krämpfe, lediglich bei 9 Tieren ein Verschwinden der klonischen Phase, beobachtet wurde. Das liegt offenbar daran, daß die maximal erreichte, durchschnittliche Krampfschwellenerhöhung noch nicht 25% gegenüber dem Ausgangswert betrug.

Wenn man sich zur Deutung dieser Erscheinungen die Vorstellung zu eigen machen will, daß der „Schrittmacher" für klonische Krämpfe im Cortex cerebri und der für tonische Krämpfe vorwiegend im Subkortex zu suchen ist, so wäre eine Erklärung einfach zu geben. Das hieße aber auch, daß die krampfwidrige Wirkung in den hier wiedergegebenen Fällen mit der narkotischen Wirkung dieser Stoffe parallel geht. Die zuerst eintretende „Narkose" des Kortex führte zu einem Verschwinden der klonischen Krämpfe, die weiterhin erfolgende „Narkose" des Subkortex hernach auch zu einem Ausfall der tonischen Krampffunktion der niederen Hirnzentren.

Ob allerdings diese Überlegungen richtig sind, können wir aus den hier wiedergegebenen Versuchsergebnissen nicht schließen. Nur die systematische Untersuchung bestimmter Gruppen narkotisch wirkender Stoffe und anderer Faktoren, die die zentrale Erregbarkeit beeinflussen, Voraussetzung einer narkotischen Wirkung sind, sie überhaupt bedingen, oder dabei zumindest auftreten, wie z. B. Veränderungen der Zellpermeabilität, Veränderung der Polarisierbarkeit usw. kann hier eine bessere Klärung herbeiführen.

Zusammenfassung.

Es wurde untersucht, ob sich die Elektrokrampfmethode als Bestimmungsmethode der Krampferregbarkeit am Tier auch zum Nachweis

und zur Darstellung der Größe und der Dauer der gegen Krämpfe gerichteten Wirkung bestimmter Arzneistoffe eignet. Wir prüften den Einfluß verschiedener Dosen Chloralhydrat, Urethan, Chloreton, Luminal-Na. und Veronal-Na. auf die Wechselstromkrampfschwellen männlicher Meerschweinchens.

1. Mit Hilfe der Wechselstrommethode gelingt der Nachweis der krampferregbarkeitsherabsetzenden Wirkung bestimmter Substanzen.

2. Subnarkotische Dosen setzten die Krampfschwellen bereits deutlich herauf.

3. Der Wirkungsgrad ist von der zugeführten Dose abhängig.

4. Es gelingt, die Dauer der Wirkung und den Zeitpunkt der maximalen Wirkung zu ermitteln.

5. Größere Dosen der parenteral zugeführten untersuchten Narkotika wirken länger anhaltend als kleinere Dosen. Der Zeitpunkt der maximalen Wirkung liegt bei Anwendung größerer Dosen später.

6. Die Methode eignet sich zur vergleichenden Bestimmung von solchen Substanzen, die die Krampferregbarkeit beeinflussen.

7. Ist die narkotische Wirkung bereits so groß, daß z. B. die Reflextätigkeit aufgehoben ist, kann eine Krampfschwellenbestimmung nicht mehr durchgeführt werden. Die Methode ist also in der oben angeführten Weise zur Bestimmung der Narkosetiefe unbrauchbar.

8. Bei Zunahme der Wirkung verschwinden beim Krampf zuerst regelmäßig die klonischen Zuckungen, bei weiterer Zunahme auch die tonischen Krampfbilder. Bei abklingender Wirkung treten zuerst die tonischen Krampfphasen und hernach auch die klonischen Krämpfe wieder auf.

Literatur.

[1] Gerlich, N.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. 1947. — [2] Gerlich, N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (erscheint demnächst).

Dr. Norbert Gerlich, Wissenschaftliche Abteilung der Chemischen Fabrik Dr. August Wolff, K.G. Bielefeld.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 301—323 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Letalitätsbestimmungen und Variation.

Von

Werner Kalow.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Dezember 1948.)

Stellt man den Letalitätsprozentsatz eines Tierkollektivs als Funktion einer steigenden Reihe von Giftdosen graphisch dar, erhält man eine S-förmige, aber meist asymmetrische Kurve. In der Regel wird die Kurve erst symmetrisch, wenn man mit dem Logarithmus der Dosen rechnet. Wird heute der Verlauf einer derartigen Letalitätskurve experimentell bestimmt, ist das Ziel der Untersuchung fast stets die Errechnung der mittleren tödlichen Dosis, der LD 50, die durch den Mittelpunkt der Kurve gegeben ist.

Viel weniger Interesse erweckt gewöhnlich die Breite der Kurve, also ihre Neigung bzw. ihre Steilheit. Diese Neigung ist ein Ausdruck für die Tiervariation, worauf wohl Shackell[1] als erster hingewiesen hat. Für Trevan[2] (1927) stand es fest, daß bei verschiedenen Pharmaka auch die Steilheit der Kurven sehr verschieden sein kann, und er gebrauchte daher den Ausdruck „the characteristic" für diese Kurven. Gaddum[3] schlug 1933 ein Maß für die Breite der Letalitätskurven vor, welches ihm eine kennzeichnende Größe für jedes Pharmakon war. 1937 beschäftigte sich Clark[4] sehr eingehend mit der Frage, ob die charakteristischen Kurven „einfache Ausdrücke für die individuelle Variation sind oder ob sie einen chemischen Prozeß ausdrücken, der durch die individuelle Variation verzerrt wird".

Aus all dem geht hervor, daß die Variationsbreite für jede pharmakologische Wirkung eine eigentümliche, charakteristische Größe ist, wenn man alle übrigen Faktoren konstant erhält, die die Variation außerdem beeinflussen können. Ich habe beobachtet, daß bei einer Substanz differente Variationsbreiten vorkommen können, wenn man verschiedene Applikationsarten wählt. Um die Folgerungen zu verdeutlichen, die aus diesen einfachen Befunden gezogen werden müssen, sollen jedoch alle Faktoren kurz erwähnt werden, von denen das Ausmaß der Variation abhängt. Das erscheint besonders gerechtfertigt, da seit den Darstellungen von Gaddum[3] und Clark[4] neues Beobachtungsmaterial auf diesem Gebiet vorliegt.

Da es notwendig ist, einige Maßzahlen für die Variation zu gebrauchen, müssen als erstes ihre Definitionen und deren mathematische Grundlagen skizziert werden.

Definition der Variationsmaße.

So wie man für ein einzelnes Atom keine sicheren Voraussagen über sein Verhalten machen kann, so wenig kann man dies für ein Lebewesen. Vom Individuum her gesehen erscheint die Variation darum als eine Unregelmäßigkeit. Aber wie für Atommassen umfassende Angaben möglich sind, so auch für Kollektive von Organismen, da die Verteilung der Varianten dem BERNOULLIschen Verteilungsgesetz folgt. Folgende Beziehungen ergeben sich für den Spezialfall einer Dosissterblichkeitsrelation zu der GAUSSschen Häufigkeitsverteilung:

Stellt man den Letalitätsprozentsatz eines Tierkollektivs als Funktion des Logarithmus der Dosis graphisch dar, erhält man eine symmetrische, S-förmige Kurve, die mehr oder weniger steil verlaufen kann. Diese Letalitätsprozentsatzkurve ist eine Aufzählungskurve, d. h. sie entspricht der integrierten GAUSSschen Häufigkeitskurve. Eine flachere Letalitätskurve hat daher dieselbe Bedeutung wie eine breitere Häufigkeitskurve.

Die Letalitätskurve läßt sich als Aufzählungskurve durch Verzerrung der Ordinate nach dem GAUSSschen Integral in eine Gerade verwandeln. Dies geschieht, wenn man rechnerisch statt des Letalitätsprozentsatzes die „normale äquivalente Abweichung" nach GADDUM[3] einsetzt, oder wenn man für die graphische Darstellung ein „Wahrscheinlichkeitsnetz" verwendet, wie es von HAZEN[5] konstruiert wurde*. Die so erhaltene Regressionslinie, die *Letalitätsgerade*, bildet mit der Abszisse einen Winkel, der ein Maß für die Neigung der Wirkungsprozentsatzkurve und damit ein Maß für die Breite der entsprechenden Häufigkeitskurve ist.

Das gegebene Maß für die Breite einer Häufigkeitskurve und damit für die Größe der Variation ist die Standardabweichung. Da ein logarithmischer Abszissenmaßstab in den meisten Fällen die Voraussetzung für eine normale, d. h. symmetrische Letalitätskurve ist (vgl. CLARK[4]), mißt man hier die Standardabweichung auch am besten in Dosenlogarithmen. Für diese Größe hat GADDUM[3] die Bezeichnung λ eingeführt. Da diese Bezeichnungsweise auch in HEFFTERS Handbuch der Pharmakologie aufgenommen ist[4], möchte ich mich ebenfalls daran halten. λ ist identisch mit σ, wie es z. B. VAN DER WAERDEN[7] gebraucht.

Wenn die Ordinate nicht nach dem Letalitätsprozentsatz, sondern nach dem GAUSSschen Integral geteilt ist, so entspricht einer Sterblichkeit von 50% der y-Wert Null, 84% der y-Wert + 1, 16% der y-Wert — 1. Graphisch ermittelt man daher den Wert von λ für eine Letalitätskurve oder -gerade, indem man für die Werte $y = +1$ und $y = -1$ die entsprechenden Abszissenwerte aufsucht und deren halbe Differenz bestimmt, d. h. also

$$\lambda = \frac{\log \mathrm{LD}\ 84 - \log \mathrm{LD}\ 16}{2} = \log \mathrm{LD}\ 84 - \log \mathrm{LD}\ 50.$$

Arithmetisch entspricht diese Größe dem reziproken Wert Redes gressionskoeffizienten b, also $\lambda = \frac{1}{b}$ [2, 24]. Der Richtungskoeffizient $b = \frac{dy}{dx}$ ist der Tangens des Winkels, den die Letalitätsgerade mit der x-Achse bildet. Für die arithmetische Ermittlung der genannten Werte gelten folgende Beziehungen:

$b = \frac{1}{\lambda} = \frac{dy}{dx} = \frac{\sum g'\, y'\, (x' - \bar{x})}{\sum g'\, (x' - \bar{x})^2}$, wobei $\bar{x}$ der nach dem Gewicht der Beobachtungen g' korrigierte Mittelwert der gefundenen Werte x' ist (PRIGGE u. SCHÄFER[8]).

* Eine weitere grundsätzlich ähnliche Methode wird in der amerikanischen Literatur häufig verwandt. Dabei wird die Ordinate in „probits" (= probability units) eingeteilt (BLISS[6]).

Für die Bestimmung des Gewichts der Beobachtungen ist die Methode von PRIGGE und SCHÄFER[8] der von GADDUM[3] (s. auch BURN[9]) vorzuziehen, da sie korrekter und nicht schwieriger ist. Bei PRIGGE finden sich auch die mathematischen Ableitungen der oben genannten Formeln und eine gute praktische Anweisung zur graphischen Ermittlung der Letalitätsgeraden.

Die Umrechnung von Tödlichkeitsprozentsätzen in die y-Werte der normalen äquivalenten Abweichung kann mit Hilfe jeder Tabelle des GAUSSschen Wahrscheinlichkeitsintegrals vorgenommen werden. Solche Tabellen finden sich wohl in jedem Lehrbuch der statistischen Methoden. (Von handlichen Büchern ist das in der Schweiz erschienene von A. LINDER: „Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure" zur Zeit das modernste in deutscher Sprache[10].) In der medizinischen Literatur finden sich Umrechnungswerte ebenfalls mehr oder weniger vollständig angegeben[2, 4, 7, 9, 11]. Praktischer ist es jedoch wohl, graphisch mit einem Wahrscheinlichkeitsnetz zu arbeiten, was man sich gegebenenfalls selbst konstruieren kann[8].

Aber auch wenn der Versuch nach BEHRENS und KÄRBER[11, 12] angeordnet ist, läßt sich die Neigung der Kurve nach TREVAN (b. GADDUM[3]) mit einer kleinen Korrektur nach VAN DER WAERDEN[7] berechnen.

$$\lambda^2 = \frac{1}{b^2} = \sum_i (p'_{i+1} - p'_i)\left(m - \frac{x'_i - x'_{i+1}}{2}\right)^2 - \frac{d^2}{12} + \mu^2.$$

x'_i, x'_{i+1} usw. sind die Logarithmen der Dosen mit den entsprechenden Wirkungen p'_i, p'_{i+1} usw.; m = log LD 50, d = Differenz der aufeinanderfolgenden Dosenlogarithmen, μ = der mittlere Fehler des log LD 50.

Da das für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehende Tiermaterial beschränkt war, bestand der Wunsch, die Fehlerbereiche auch in der graphischen Darstellung zum Ausdruck zu bringen. Das läßt sich am einfachsten nach PRIGGE und SCHÄFER[8] erreichen, indem man den Mutungsbereich jeder einzelnen Bestimmung errechnet oder aus Tabellen von SCHELLING[13] entnimmt und in das Wahrscheinlichkeitsnetz einträgt. Die Letalitätsgerade wird dann so gelegt, daß sie möglichst alle senkrecht verlaufenden Mutungsbereichlinien schneidet, wie aus den folgenden Abbildungen ersichtlich ist. Im vorliegenden Fall wurden stets die Mutungsgrenzen für $k = 1$ im Sinne von PRIGGE und SCHÄFER verwendet, d. h. der Fehlerbereich ist so gewählt, daß durchschnittlich jedes dritte Ergebnis außerhalb der theoretisch richtigen Letalitätsgeraden liegen wird. Da der Mutungsbereich bei wachsender Tierzahl kleiner wird und sich ebenfalls bei den mittleren Prozentsätzen verringert, wenn man sie im Koordinatensystem darstellt, kann man aus den Zeichnungen abschätzen, mit welcher Wahrscheinlichkeit die gezeichnete Letalitätsgerade dem theoretisch richtigen Verlauf entspricht. Ein Ergebnis mit weniger als 100 Tieren wird stets der Kritik weit offen bleiben müssen, wenn nicht sehr krasse Unterschiede zwischen den einzelnen Letalitätsgeraden auftreten. Eines der zu schildernden Versuchsergebnisse wird also nur deshalb bestehen können, da dort eben große Differenzen vorliegen.

Die Formel für die Bestimmung der Mutungsgrenzen wurde von PRIGGE bereits im Jahre 1937[14] aufgestellt. Seine Mutungsgrenzen entsprechen den fiducial limits[15] der angelsächsischen Literatur, wie aus den Erörterungen von v. SCHELLING[13, 16] und LUDWIG[17] hervorgeht.

Die Faktoren, von denen die Variationsbreite abhängt.

1. Die Tierkollektive. Aus praktischen Gründen begann die Erforschung der Frage, wie man die Variation bei biologischen Testen

so niedrig wie möglich halten könne. Denn die mittlere tödliche Dosis kann um so leichter exakt festgelegt werden, je steiler die Letalitätskurve verläuft, je kleiner also der Quotient LD 100 : LD 0 ist. Da aber gerade bei Antiseren oder Antitoxinen, die gemischt mit dem entsprechenden Toxin injiziert werden, dieser Quotient gewöhnlich sehr groß ist, wurde besonders von hygienischer Seite danach gestrebt, die Letalitätskurve für bestimmte Antiseren so steil als möglich zu machen, um mit geringem Tierverbrauch zu genauen Standardwerten zu kommen. So hat PRIGGE die Immunisierbarkeit von Meerschweinchen gegen Diphtherietoxin untersucht. Die Dosen, die zum Schutz der „reagibelsten" und der „lässigsten" Tiere notwendig waren, verhielten sich bei seinem Frankfurter Tiermaterial wie 1 : 32000. Bei Verwendung immer reinerer Inzuchtstämme ließ sich dies Verhältnis aber auf 1 : 25 bringen! Von pharmakologischer Seite hat WINTON[19] bereits 1927 aus den gleichen Überlegungen heraus für Toxizitätsbestimmungen von Urginea maritima erbreine Rattenstämme verwandt. Die Vereinheitlichung des Tiermaterials läßt sich aber noch weiter treiben durch Verwendung von Tieren nur eines Geschlechts[19, 20, 21, 22, 23, 24] und von bestimmtem Gewicht [25, 26] und Alter[22, 27, 28, 29].

2. Äußere Einflüsse. Äußere Einflüsse spielen für die Variation eine große Rolle, wenn die Tiere nicht einheitlichen Bedingungen unterworfen sind. So kann die Giftempfindlichkeit der Laboratoriumstiere durch Erhöhung der Raumtemperatur gesteigert[30, 31, 32] oder auch herabgesetzt werden[33, 34]. Eine Kaliumausschwemmung bei Unterkühlung erklärt manche der Erscheinungen[35]. Bei Untersuchungen über eine breite Temperaturskala zeigten Mäuse bzw. Ratten im Bereich von 18—22° eine besondere Resistenz gegenüber so verschiedenen Substanzen wie Novocain[36], Dimercaptopropanol (BAL[37]) und α-Naphthylthioharnstoff (ANTU[38]). Auch die Ernährung der Versuchstiere ist nicht gleichgültig[39], und selbst ein einzelnes Vitamin kann gegebenenfalls eine Giftwirkung erhöhen[40]. Der Wasserhaushalt spielt eine Rolle[32]. Schließlich können selbst Geräusche und die Käfiggröße einen Einfluß ausüben[32].

3. Die Pharmaka. Wie erwähnt, hat schon TREVAN[2] erkannt, daß das Ausmaß der Variation gegenüber den einzelnen Pharmaka durchaus verschieden bleibt. Verhältnismäßig gering ist die Variation stets gegenüber den Schwermetallen[4], Neosalvarsan[41] und den Herzglykosiden, auch wenn man die Angaben verschiedener Autoren vergleicht[3], die mit differenten Prüfverfahren an verschiedenen Tierarten gewonnen wurden (BURN[9]). Demgegenüber findet sich stets eine besonders starke Variation bei Dysenterietoxin[42] und Adrenalin[43]. TREVAN[2], GADDUM[3] und CLARK[4] bringen noch eine ganze Reihe weiterer Beispiele für die Unterschiede der Variabilität bei Pharmaka bzw. Giften.

Besonders beweiskräftig erscheinen mir aber einige Versuche an niederen Lebewesen, z. B. Insekten. So verlaufen die Letalitätskurven für Dichlorbenzol und Tetramethylammoniumsulfat bei Aphis rumicis völlig verschieden (Tattersfield, zit. nach Clark[4]). Wenn man feststellt, wieviel Bakterien nach Einwirkung von Desinfektionsmitteln noch keimfähig sind, und wenn man die Anzahl der überlebenden Bakterien für abgestufte Konzentrationen des Desinfizienz einzeln bestimmt, so erhält man ebenfalls Letalitätskurven, die den Mortalitätskurven höherer Tiere prinzipiell analog sein dürften. Bei einer solchen Untersuchung zeigte es sich, daß sowohl gegenüber Bacterium Coli als auch Staph. aureus for Formalin eine flache, für Lysol und Phenol dagegen jedesmal eine steile Kurve eigentümlich war (Dreyer und Campbell-Renton[44]).

Nach ausgedehnten Untersuchungen haben besonders Rahn[45] und später Schubert[46] behauptet, daß die Giftwirkungskurven bei Bakterien nicht so sehr auf der Variation beruhten, sondern vor allem mit Hilfe der Treffertheorie gedeutet werden müßten. Timoféeff-Ressovski und Zimmer lehnen trotzdem Schuberts Formulierungen als mathematisch nicht haltbar ab[47]. Das hier zitierte Beispiel zeigt, daß im gegenseitigen Verhalten der Dosiseffektkurven verschiedener Pharmaka bei Bakterien einerseits und höheren Lebewesen andererseits analoge Gesetzmäßigkeiten zu gelten scheinen.

Es gibt nun eine ganze Reihe von Beispielen, die dafür sprechen, daß die mit einer bestimmten pharmakologischen Reaktion verknüpfte Variationsgröße charakteristischer und daher auch konstanter ist als die mit einer bestimmten Dosis verknüpfte Wirkungsgröße. Im Falle der Tödlichkeitsbestimmungen heißt das, daß die LD 50 bei einem bestimmten Tierkollektiv stärker schwanken kann als die Breite oder die Neigung der Dosissterblichkeitskurve.

Einige Beispiele seien erwähnt. Morrell und Chapman[41] haben 12 Letalitätskurven mit Neosalvarsan an je 100 Ratten eines erbreinen Stammes aufgestellt. Die LD 50 schwankte dabei zwischen 370 und 500 mg/kg ohne erkennbare äußere Ursache. Diese Abweichung ist größer als die dreifache Standardabweichung, sie beruht also nicht auf dem Fehler der Auswahl; aber die Neigung der 12 Kurven, d. h. die Größe der Variation blieb gleich. Die Untersuchung von Durham, Gaddum und Marchall[25] über die Toxizität des Neosalvarsans bei Mäusen hatten ein analoges Ergebnis mit dem internationalen Standard. Bei schwereren Mäusen war die Empfindlichkeit größer, aber die Variation innerhalb beider Gewichtsklassen war gleich. Vergleicht man die beiden Arbeiten miteinander, so findet man auch bei den zwei Tierarten Letalitätskurven ähnlicher Neigung, aber die LD 50 für Ratten lag im Mittel bei 420 mg/kg, bei 13 — 15 g schwereren Mäusen jedoch bei 580 mg/kg. Dieselben Verhältnisse liegen bei jahreszeitlichen Schwankungen der tödlichen Dosen vor, wie es Trevan[42] und Prigge[48] für Toxine und de Beer, Hjort und Cook[49] für verschiedene Schlafmittel nachgewiesen haben. Analoge Ergebnisse zeigten sich auch bei nahrungsbedingten Empfindlichkeitsänderungen der Tiere[39] oder bei Geschlechtsunterschieden[24]. Ein sehr gutes Beispiel an einfachen Verhältnissen sei schließlich noch erwähnt[50]: Die Sporen von 8 verschiedenen Fungi wurden mit Schwefelwasserstoff abgetötet. Jedesmal war die Neigung der Letalitätskurven ähnlich flach,

obwohl die mittleren tödlichen Dosen sich um das 1400fache unterschieden. Mit anderen Substanzen wurden steilere Kurven erzielt [4].

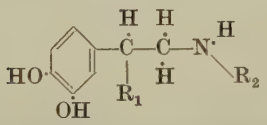
Doch kann man noch auf ganz andere Weise belegen, daß die Variation eine sehr charakteristische Größe ist. Denn offenbar lassen sich bei homologen Reihen gesetzmäßige Unterschiede in der Variationsbreite finden. Da es meines Wissens noch nicht versucht worden ist, die chemische Struktur und die Variationsgröße in Relation zu bringen, sei das folgende Beispiel etwas ausführlicher behandelt.

LANDS, NASH, DERTINGER, GRANGER und MCCARTHY [51] bestimmten die Toxizität von 12 Oxytyraminderivaten an Mäusen einer Tierkolonie

Tabelle 1. *Akute intraperitoneale Toxizität.*

Verbindung*	R_1	R_2	Tierzahl	Toxizität		
				LD 10 mg/kg	LD 50 ± m. F. mg/kg	LD 90 mg/kg
Epinin	H	CH_3	115	350	770 ± 71,3	1700
1554	H	$CH(CH_3)_2$	42	410	500 ± 21,9	615
Arterenol	OH	H	72	4,6	15,6 ± 3,8	53,5
d-l-Adrenalin . .	OH	CH_3	80	2,92	7,8 ± 1,3	21
1516	OH	C_2H_5	82	11,1	27,5 ± 4,23	67,8
Aludrin	OH	$CH(CH_3)_2$	273	377	494 ± 13,9	650
1505	OH	$C(CH_3)_3$	74	310	370 ± 11,5	443
1424	OH	$CH(CH_3)C_2H_5$	76	410	464 ± 8,6	520
1960	OH	C_4H_9	59	278	347 ± 12,2	432
Adrenalon . . .	=O	CH_3	73	750	902 ± 25,3	1090
1590	=O	$CH(CH_3)_2$	56	387	470 ± 15,6	570
Adrenalin	OH	CH_3	80	2,15	4,6 ± 0,55	9,9

*



Nach LANDS, NASH, DERTINGER, GRANGER u. MCCARTHY: J. Pharmacol. (Am.) **92**, 369 (1948).

bei konstanter Temperatur von 24° durch intraperitoneale Injektion. Da die Autoren nicht nur die LD 50, sondern auch die LD 10 und LD 90 angeben, lassen sich die einzelnen Letalitätsgeraden rekonstruieren. Auch die für jede Bestimmung gebrauchte Tierzahl ist erwähnt, so daß ein Anhalt für die Genauigkeit der Arbeit vorliegt. Tabelle 1 gibt die Ergebnisse wieder. Die Zahlen sind Milligramm je Kilogramm der betreffenden Hydrochloride oder Azetate. Nach Umrechnung der Dosen in $\log_{10}$ Millimol je Kilogramm wurde Abb. 1 gezeichnet.

Die Abbildung scheint mir nun einen Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Neigung der Letalitätsgeraden nahezulegen, und zwar ganz unabhängig von der Größe der LD 50. Am flachsten verläuft die Gerade, die die Arterenolwirkung anzeigt. Etwas

steiler steigen die Letalitätsgeraden der am Stickstoff mit einer Methyl- oder Äthylgruppe substituierten Körper an, wie l- und d-, l-Adrenalin, Epinin und die Verbindung Nr. 1516. Der Substitution nach müßte auch das Adrenalon in diese Gruppe gehören, aber anscheinend spielt hier die Ketogruppe eine besondere Rolle. Die noch nicht besprochenen Substanzen sind am Stickstoff alle mit schwereren Gruppen substituiert, also C_3H_7 oder C_4H_9, wobei es sich außer bei Substanz Nr. 1960 stets um verzweigte Ketten handelt. Die ganze Gruppe dieser 6 Verbindungen hat wiederum Letalitätsgeraden von untereinander ähnlicher

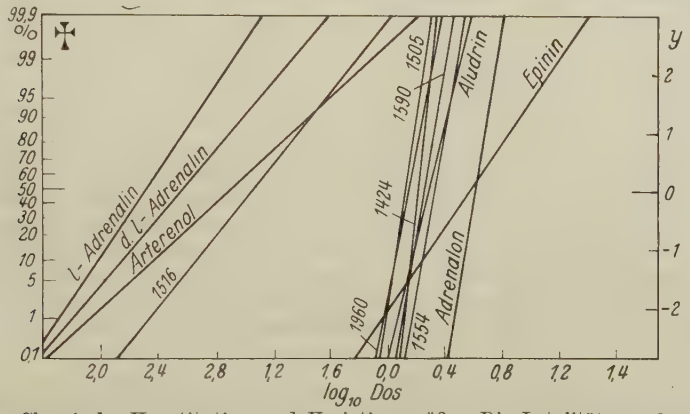


Abb. 1. Chemische Konstitution und Variationsgröße. Die Letalitätsgeraden von 12 Oxytyraminderivaten (nach Experimenten von Lands, Nash, Dertinger, Granger und McCarthy[51]. Die flachste Gerade = keine N-Substitution (Arterenol); Mittlere Steigung = Methyl- bzw. Äthylsubstitution (Adrenalin u. a.); Starke Steigung = Isopropyl- bzw. Isobutylsubstitution (Aludrin u. a.). Einzelheiten siehe Text und Tabelle 2.

Neigung, aber in der Gesamtheit steiler als die methyl- oder äthylsubstituierten Körper.

Doch auch wenn man innerhalb dieser Gruppe zu differenzieren sucht, scheint noch die gleiche Gesetzmäßigkeit zu gelten; denn die Verbindungen Nr. 1424 und 1505, die eine Isobutylgruppe enthalten, haben die steilste Neigung von allen untersuchten Substanzen überhaupt. Bemerkt sei, daß die eine Ketogruppe tragende Substanz Nr. 1590 die steilste Letalitätskurve von den isopropylsubstituierten Körpern hat. Vielleicht ist damit die Ketogruppe als ein variationsvermindernder Faktor gekennzeichnet, wofür auch die oben erwähnte Ausnahmestellung des Adrenalons spricht. Da die beiden Ketoverbindungen Letalitätsgeraden fast gleicher Neigung haben, kann man vielleicht sogar sagen, daß in diesem Falle die Ketogruppe die Größe der Variation überhaupt bestimmt.

Tabelle 2 erläutert das Gesagte. Außerdem sind einige Angaben über die Wirkung auf den virginellen Meerschweinchenuterus aufgenommen. Die Trennungslinie zwischen Adrenalin und Aludrin, die

Tabelle 2. *Ordnung einer homologen Reihe nach der Variationsgröße.*

λ	Substanz	N-Substitution	Symbol für die Verzweigung der Seitenkette	O im Molekül	Isol. Meerschweinchenuterus	Blutdruckeffekt	LD 50
0,42	Arterenol . . .	—	.	OH	+	+	15,6
0,33	d-l-Adrenalin .	CH_3	—	OH	+	+	7,8
0,31	1516	C_2H_5	—	OH	+	±	27,5
0,27	Epinin	CH_3	—	—	+	+	770
0,26	l-Adrenalin . .	CH_3	—	OH	+	+	4,6
0,092	Aludrin. . . .	C_3H_7	=	OH	—	—	494
0,074	1960	C_4H_9	—	OH	—	—	347
0,069	1554	C_3H_7	=	—	—	±	500
0,066	1590	C_3H_7	=	=O	—	±	470
0,060	Adrenalon . .	CH_3	—	=O	—	+	902
0,058	1505	C_4H_9	≡	OH	—	—	370
0,040	1424	C_4H_9	≡	OH	—	—	464

λ = Variationsbreite der Letalitätskurven. Uterus: + bedeutet Erregung, — Hemmung des isolierten Organs. Blutdruck: + pressorischer, — depressorischer Effekt; ± bedeutet Blutdrucksteigerung, gefolgt von einer Senkungsphase. Bei Substanz 1590 war die Senkungsphase nur zuweilen vorhanden. Angaben nach LANDS u. Mitarb.: J. Pharmacol. (Am.) **92**, 369 (1948).

den größten Sprung in der Variationsbreite anzeigt, gruppiert die Substanzen auch nach ihrer Wirkung auf die glatte Muskulatur. Das spricht für eine tiefere Bedeutung dieser Einteilung, selbst wenn sich die pharmakodynamischen Effekte nicht alle glatt in das Schema einfügen, wie es das Beispiel der Blutdruckwirkung zeigt. Zwischen der mittleren tödlichen Dosis und der Variationsgröße besteht kein klarer Zusammenhang.

Auf weitere Einzelheiten einzugehen, würde zu weit führen, denn man muß natürlich mit einem Versuchsfehler für die Größe λ rechnen. Die Tierzahlen für jede Einzelkurve sind schließlich nicht allzu groß. Andererseits dürften 1063 Tiere für die 12 Letalitätsuntersuchungen genug sein, um die Gesamtanalyse bis hierher zu rechtfertigen. Belege für die Richtigkeit der Angaben von LANDS und Mitarbeitern sind in der Literatur schwer zu finden; jedoch hat SCHULTZ[43] bei subkutaner Injektion von Adrenalin an 122 Mäusen einen Wert von $\lambda = 0{,}37$ erhalten, was den Angaben von LANDS und Mitarbeitern recht gut entspricht. Manche anderen Letalitätsbestimmungen sind zu unzulänglich, um hier zu nützen (KONZETT[52]; MARSH, PELLETIER und ROSS[53]). Bei einer neueren Untersuchung von l- und d-Adrenalin, die hier von Interesse wäre, da die Ergebnisse etwas abweichen, muß man aus den Zahlenangaben trotz der Hinweise im Text schließen, daß die Dosisreihe besonders nach oben hin nicht weit genug fortgeführt worden ist (MARQUARDT und KOCH[54]).

Die Wirkung eines jeden Pharmakons variiert also nach einer biologischen Gesetzmäßigkeit. Über diese Naturgesetzlichkeit ist aber noch nicht genug bekannt, um Deutungsversuche auf physikalischer

oder chemischer Basis sehr aussichtsreich zu machen. Vielmehr scheint mir die einfache Beobachtung und Registrierung von Variationsgrößen das nächstliegende Erfordernis zu sein.

Toxizitätsbestimmungen mit Phenyläthanolamin und Pervitin bei subkutaner und intravenöser Injektion.

A. Methodik.

Zu den Letalitätsbestimmungen mit Phenyläthanolamin wurden weiße Ratten im Gewicht zwischen 90 und 160 g aus der Zucht des hiesigen Institutes verwandt. Die subkutanen Injektionen und die Applikationen in eine Schwanzvene erfolgten an verschiedenen Tagen. Für die venöse Anwendung wurde eine 3%ige, also etwa isotonische Lösung von Phenyläthanolaminsulfat benutzt, während für die subkutane Injektion stets eine 5%ige Lösung gebraucht wurde.

Die weißen Ratten für die Pervitinversuche stammten ebenfalls aus einer Tierkolonie. Sie wogen zwischen 70 und 150 g. Die Weibchen waren in der Überzahl 3:1. Die Tiere wurden nach Gewicht und Geschlecht so eingeteilt, daß die Kollektive für die intravenöse und subkutane Injektion gleich waren, während das für jede einzelne Kurve verwandte Tiermaterial nicht sehr einheitlich war. im übrigen wurde darauf geachtet, daß alle äußeren Bedingungen, wie vor allem die 12stündige Nüchternperiode oder die Wasserversorgung, gleich waren. Die Injektionen erfolgten an verschiedenen Tagen bei einer Stalltemperatur von $21 \pm 2{,}5^0$ an 130 Ratten intravenös und 118 Ratten subkutan. Zur Kontrolle wurden einmal je 17 Ratten intravenös und subkutan bei künstlicher Erhöhung der Raumtemperatur auf 32^0 gespritzt. Nur bei einem Versuch mit subkutaner Injektion bei 32^0 (schwüles Sommerwetter) wurden 20 schwarzweiße Ratten anderer Herkunft verwendet. Zu den einzelnen Injektionen waren die Ratten stets in Gruppen zu mindestens 10 Tieren eingeteilt.

Das Pervitin war stets frisch gelöst, die Lösung war gewöhnlich 1% und nur bei den höchsten Dosierungen 2%ig. Die Isotonie wurde durch Kochsalzzusatz erreicht. Die Lösungen wie die Spritzen und Kanülen waren sauber, aber nicht sterilisiert. Sämtliche Injektionen wurden mit der gleichen Tuberkulinspritze von einer Person mit der gleichen Geschwindigkeit durchgeführt. Nach der intravenösen Injektion wurde stets $^1/_4$ cm³ isotonischer Kochsalzlösung nachgespritzt. Sämtliche Ratten blieben nach der Injektion so unter Kontrolle, daß der Verlauf der Vergiftung genau verfolgt werden konnte. Alle Tiere, die innerhalb von 72 Stunden starben, wurden als vergiftet gezählt.

B. Ergebnisse.

1. *Phenyläthanolamin.* Die Resultate der Toxizitätsbestimmungen sind in der Abb. 2 dargestellt. Bei intravenöser Injektion wurde eine verhältnismäßig steile, gut auswertbare Letalitätsgerade erzielt, aber nicht mit subkutanen Spritzen. Die Vorversuche zur Bestimmung der subkutanen Toxizität von Phenyläthanolamin zeigten, daß die LD 50 nicht unterhalb der recht hohen Dosis von 1 g/kg liegen konnte. Eine Erhöhung der Dosis war nur bis zu einem gewissen Grade möglich, da die Flüssigkeitsmenge und die Konzentration der Injektionslösung nicht weit gesteigert werden konnten. 4 cm³ einer 5%igen Lösung (Isotonie bei 3%) je 100 g Ratte oder 2 g/kg erschienen mir als obere

Grenze. Auffallend war, daß bei dem zur Verfügung stehenden Tiermaterial von 55 Ratten mit der Erhöhung der Dosis keine Steigerung der Letalität verbunden war. Sicherlich hätte sich bei großem Tiermaterial eine Parallelität von Dosis und Wirkung wenigstens soweit gezeigt, daß eine Extrapolation auf die LD 50 möglich wäre. Mit einem sehr kleinen Winkel zwischen Abszisse und Letalitätsgerader müßte man aber auch dann rechnen. Jedenfalls ist trotz der geringen Tierzahl der Unterschied der Richtung beider Letalitätsgeraden statistisch signifikant.

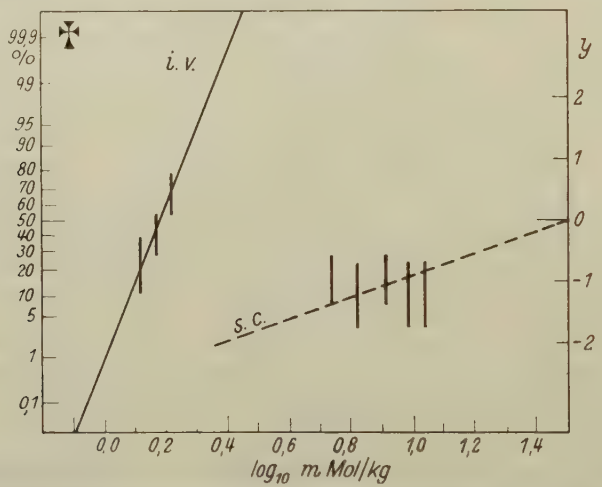


Abb. 2. Toxizitätsbestimmungen mit Phenyläthanolaminsulfat. i.v. = intravenöse Injektion von 240, 270 und 300 mg/kg. Es starben 2/9; 6/15 bzw. 10/15 Ratten. s.c. = subkutane Injektion von 1000, 1200, 1500, 1800 und 2000 mg/kg. Es starben 2/13; 1/10; 2/12; 1/10 und 1/10 der Ratten. Die eingezeichneten Fehlerbereiche der Einzelbestimmungen sind berechnet nach den Mutungsgrenzen für $k = 1$ (s. „Definition der Variationsmasse"). Die subkutane Letalitätsgerade ist willkürlich durch die Mutungsbereiche gelegt.

Die Beobachtung der vergifteten Ratten ergibt folgendes Bild: Nach der intravenösen Injektion sterben die Tiere innerhalb von 3 Min. oder überleben endgültig, wie es ALLES[55] ebenfalls gesehen hat. Die Tiere zittern, haben gesträubtes Fell, maximalen Exophthalmus, äußerst blasse Haut und terminal meist krampfartige Zuckungen. Sehr deutlich (viel deutlicher als beim Pervitin) kündigt sich das Überstehen der Wirkung durch bessere Hautdurchblutung an, selbst wenn durch einige Minuten noch leichte Krämpfe fortbestehen. Am nächsten Tag erscheinen die Tiere gewöhnlich wieder gesund. Der Tod dürfte also im wesentlichen auf einem Kreislaufversagen beruhen.

Wenige Minuten nach subkutaner Injektion beginnt ebenfalls die Kontraktion der erectores pilorum, der Exophthalmus tritt auf, wird aber nicht allzu stark, die Haut wird auffallend rot und die Venen an

Ohr und Schwanz sind gefüllt. Allmählich treten nervöse Symtome auf: Der Gang wird unsicher, manche Tiere bewegen dauernd suchend den Kopf, schließlich liegen sie auf dem Bauch, die hinteren Extremitäten sind ausgestreckt und scheinen gelähmt. Die Atmung wird regelmäßig im Laufe von Stunden langsamer und zuweilen hörbar keuchend. Der Tod tritt ungefähr nach 10 Stunden ein. Die Sektion zeigt dann ein Lungenödem stärkeren oder auch geringeren Grades, wobei die Lungen oft, aber nicht immer, braunrot sind. Überleben die Tiere,

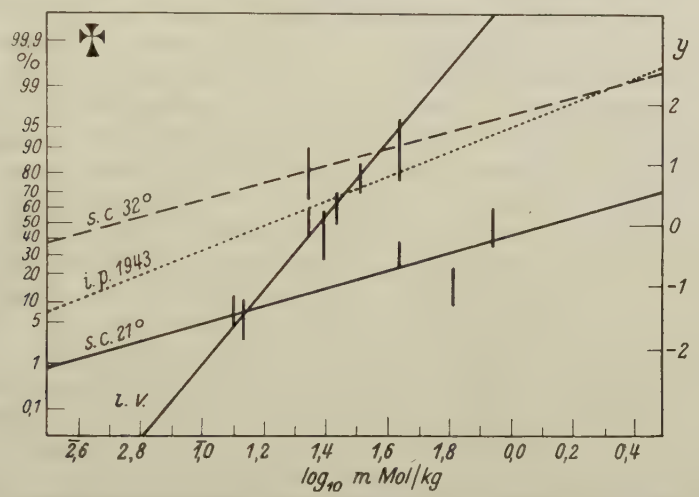


Abb. 3. Toxizitätsbestimmungen mit Pervitin-HCl. i.v. = intravenöse Injektion bei 21° Raumtemperatur von 25; 40; 45; 50 und 60 mg/kg. Es starben 2/40; 15/30; 4/10; 12/20 bzw. 23/30 Ratten. s.c. 21° = subkutane Injektion bei 21° von 23; 80; 120 bzw. 160 mg/kg. Es starben 3/48, 9/30, 3/20 bzw. 10/20 Ratten. s.c. 32° = subkutane Injektion bei 32° von 40 bzw. 80 mg/kg. Es starben 8/10 bzw. 9/10 Ratten. i.p. 1943 = intraperitoneale Injektion im Jahre 1943. Nach den Daten von Heubner und Stuhlmann[56]. Mutungsgrenzen für $k = 1$.

so erholen sie sich rasch. Aber nach einigen Tagen, oft erst 8 Tagen, stößt sich die Haut über dem Zentrum der Injektionsstelle ab und eine schließlich gut heilende Wundfläche wird sichtbar. Wegen der langen Latenzzeit dürfte diese Nekrosenbildung von den früheren Untersuchern übersehen worden sein.

2. Pervitin (1-Phenyl-2-methylaminopropan HCl). Die Ergebnisse der Pervitinversuche sind in der Abb. 3 dargestellt. Besonders wichtig sind die beiden stark gezeichneten Letalitätsgeraden, von denen die steilere Linie die Variation bei intravenöser Injektion bezeichnet. Der Unterschied zu der flacheren subkutanen Letalitätsgeraden ist deutlich. Eigenartigerweise schneiden sich die beiden Geraden. Die punktierte Linie zeigt zum Vergleich das Ergebnis von Heubner und Stuhlmann[56] mit intraperitonealer Injektion an weißen Ratten aus dem Jahre 1943. Die Winkel, die die beiden letztgenannten Linien mit der

Abszisse bilden, sind ähnlich. Die gestrichelte Linie stellt die Wirkung subkutaner Injektionen an 20 schwarzweißen Ratten bei gewitterschwülem Wetter und einer Temperatur von 32° dar. Man sieht eine überaus große Verschiebung der LD 50. Als Bestätigung, daß auch dies Ergebnis wahrscheinlich richtig ist, gilt mir ein Kontrollversuch an den sonst auch stets verwendeten weißen Ratten bei künstlicher Temperaturerhöhung auf 32° mit einer verhältnismäßig geringen Dosis, die etwa $^1/_{10}$ der subkutanen bzw. ungefähr $^1/_3$ der intravenösen LD 50 bei normaler Temperatur entsprach. Dabei erhielten je 17 Tiere intravenös bzw. subkutan 18 mg/kg Pervitin·HCl, wonach alle Ratten bis auf eine subkutan gespritzte innerhalb von 10 Stunden starben.

Die Beobachtung der vergifteten Tiere zeigte folgendes Verhalten: Wenn die Ratten eine intravenöse Injektion mit einer tödlichen Grenzdosis Pervitin bekommen haben, zittern sie oder schnellen gar ein paar Mal in die Höhe; wenige Sekunden später werden sie ruhig, und es entwickelt sich rasch ein starker Exophthalmus, das Fell sträubt sich, die Haut ist äußerst blaß. Innerhalb von 5 Min. entscheidet sich meistens, ob die Tiere in diesem Stadium eingehen. Das Überleben zeigt sich durch eine ganz leichte Besserung der Hautdurchblutung an, und allmählich kommt es dann zu den bekannten [57] zentralen Erregungserscheinungen. Diese steigern sich langsam durch 1—3 Stunden, bleiben dann für einige Zeit konstant und flauen erst im Laufe weiterer Stunden wieder ab. In dieser Periode kann die Erregung in ein Lähmungsstadium mit verminderter Atmung und stundenlanger Agonie übergehen. Von 56 durch intravenöse Injektion getöteten Tieren starben 40 innerhalb der ersten 4 Min. Die übrigen Tiere gingen in dem oder nach dem Erregungsstadium ein, aber niemals in den ersten 2 Stunden nach der Injektion.

Bei den subkutan gespritzten Tieren beginnt die kritische Zeit 3 Stunden nach der Injektion und der Tod kommt mit der gleichen langdauernden Agonie. Zuweilen hatte man den Eindruck, daß das Erregungsstadium nach subkutaner Injektion stärker ausgeprägt ist! (Bei 32° sind die einzelnen Stadien insofern nicht mehr klar zu trennen, als die Erregung und nachfolgende Lähmung sehr rasch einsetzen kann.) Wenn man darauf achtete, war auch bei Pervitindosen über 80 mg/kg nach einigen Tagen bei allen überlebenden Ratten eine kleine Hautnekrose über der Injektionsstelle entweder als Wundfläche, als kleiner Schorf oder nur als dunkler Hautfleck sichtbar.

Besprechung der Ergebnisse.

A. Allgemeines zur Frage der Variation bei verschiedener Applikationsweise.

Wenn man ein Pharmakon subkutan appliziert, ist die mittlere tödliche Dosis wohl stets höher, als wenn man es direkt in die Blutbahn

bringt. Allerdings ist das Verhältnis der subkutanen zur intravenösen LD 50 für alle Substanzen recht verschieden groß und noch nicht einmal bei Isomeren konstant[58]. Die Ursache für den Unterschied muß darin liegen, daß nach subkutaner Injektion erst eine Resorption stattfindet, die eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. In dieser Zeitspanne können Entgiftungs- oder Ausscheidungsmechanismen dafür sorgen, daß am Erfolgsorgan entweder gar nicht oder nur langsam so hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden wie nach intravenöser Injektion. Ein rein zeitlicher Unterschied im Eintreffen und in der Konzentrierung des Pharmakons an einem einzigen Rezeptor wird nun sicherlich keinen Unterschied in der Variationsgröße verursachen. Wenn die Resorption auf einfachen Diffusionsvorgängen beruht, wird man von diesem Faktor auch keine wesentliche Zunahme der Variabilität erwarten müssen. So ist am Frosch direkt nachgewiesen, daß die Resorption der Digitalis vom Lymphsack aus die Variation gegenüber intravenöser Injektion und selbst gegenüber dem isolierten Herzen nicht beeinflußt[59]. Wenn die Resorption dagegen zum komplizierten Vorgang wird, liegen die Verhältnisse anders, und zwar wohl ganz besonders dann, wenn das Pharmakon spezifische lokale Wirkungen im Subkutandepot hervorruft. Kurz gesagt, müßte man aus diesen etwas schematisierten Überlegungen heraus erwarten, daß einmal in vielen Fällen trotz Verschiebung der LD 50 keine wesentliche Änderung der Variabilität bei subkutaner Gabe eintritt. Wenn andererseits die Variabilität nach subkutaner Injektion stark vergrößert ist, müßte man eine besondere lokale Wirkung des injizierten Medikaments annehmen.

Diese Vorstellung bedarf allerdings noch experimenteller Belege, denn überwiegend sind die Angaben in der Literatur für eine solche nachträgliche Analyse nicht vollständig genug.

In der mir zugänglichen Literatur fand ich nur wenige Beispiele. So haben Latven und Molitor[60] 8 organische Lösungsmittel untersucht. Danach war die logarithmische Differenz zwischen der LD 100 und LD 0 für Äthanol, Carbitol, Diacetin, Äthylenglykol, Äthyllactat, Glyzerin, Propylen- und Trimethylenglykol bei subkutaner Anwendung in keinem Fall größer als nach intravenöser Injektion. Allerdings wurden für jede Kurve nur 6×4 Mäuse verwandt, so daß im einzelnen durchaus Korrekturen denkbar sind, aber sicher nicht für die Gesamtheit der Ergebnisse. Eine Prüfung von Octin (Methylamino-isooctan-HCl) intraperitoneal und venös ist wohl ähnlich zu bewerten (Walton, Preacher und Cannon[61]). Bei einer Untersuchung von l- und d-Miotin an Mäusen mit intramuskulärer und intravenöser Injektion war bei recht verschiedener LD 50 die Neigung aller 4 Kurven ebenfalls ähnlich (White und Stedman[62]).

Anders scheint dies Verhältnis bei den Körpern der Adrenalin-Ephedrinreihe zu sein, die lokal eine Gefäßverengung verursachen. Aus den Angaben von Chen[63] über die Toxizität des Ephedrins ist anzunehmen, daß bei verschiedenen Laboratoriumstieren die Variabilität bei intravenöser Injektion geringer ist als bei anderen Anwendungsweisen. Da Chens Versuchsanordnung allerdings nur auf die

Festlegung der minimalen tödlichen Dosis abgestimmt ist, läßt sich der Wert λ aus seinen Angaben nicht immer genau ermitteln. Für die intravenöse Injektion bei 34 weißen Ratten war jedoch $\lambda = 0{,}006$, während im hiesigen Institut bei einer Prüfung subkutaner Injektionen von Ephetonin (Merck) an 24 weißen Ratten $\lambda = 0{,}126$ gefunden wurde.

Außer bei lokaler Wirkung nach subkutaner Injektion ist auch denkbar, daß nach verschiedener Applikationsweise differente Letalitätsgerade dadurch entstehen, daß die Hauptwirkung des Pharmakons jeweils andere Organe betrifft. Deshalb müssen hier für die Deutung der experimentell gewonnenen Kurven die Beobachtungen über das Verhalten der Tiere mit herangezogen werden.

B. Wirkungsunterschiede bei verschiedener Applikationsweise als Ursache für differente Letalitätsgeraden.

a) Phenyläthanolamin. Das Phenyläthanolamin gehört in die Adrenalin-Ephedrinreihe. Es wurde erstmalig 1904 von KOLSHORN[64] hergestellt und von BARGER und DALE[65] pharmakologisch untersucht. ALLES[55] korrigierte die Ergebnisse. In den folgenden Jahren wurde es mehrfach beschrieben[66, 67, 68, 69, 70, 71]. Kürzlich wurde es in Deutschland als Norphedrin[72]* in die Therapie eingeführt.

Durch die chemische und pharmakologische Verwandtschaft ist es erklärlich, daß wohl alle geschilderten Symptome außer der mächtigen Gefäßerweiterung bei subkutaner Injektion auch nach Adrenalinvergiftung vorkommen. ROSENKRANZ[73] sagt vom Adrenalin, daß die toxische Wirkung bei verschiedener Art der Applikation vollkommen verschieden sei. Nach intravenöser Injektion trete das Versagen der Herztätigkeit durch die übermäßige Blutdrucksteigerung ein, bei subkutaner Anwendung sei das Lungenödem als subakute Folge der Kreislaufstörung die Todesursache. Sicherlich gilt diese Verallgemeinerung nicht streng für alle Tierarten und Versuchsbedingungen. Aber zur Entstehung des Lungenödems ist jedenfalls nicht nur der hämodynamische Effekt, sondern auch eine zentrale (LUISADA[74]) und eine lokale Komponente erforderlich (JARISCH und THOMA[75], RIECHERT und SCHMIEDER[76]). Die Lähmung der hinteren Extremitäten durch subkutan gegebenes Adrenalin beschreibt EMMERT[77]. Bei diesem Autor findet sich auch bereits ein Hinweis auf die Hautnekrosen durch Adrenalin. Dies Problem wurde allerdings erst 1948 gründlich studiert. DELAUNAY[78] und Mitarbeiter stellten fest, daß das Adrenalin isolierte Zellen und Gewebe nicht schädigt. Die sterilen Nekrosen bei Meerschweinchen seien reine Folgen der Gefäßwirkungen, denn die geringe Durchblutung des Gewebes mit lokaler Anoxämie, die Permeabilitätsminderung der Kapillaren selbst für Wasser und speziell die Hemmung der Diapedese der Polynukleären können stundenlang andauern.

Wahrscheinlich kann man die für die Adrenalinwirkung gegebenen Erklärungen zum größten Teil auch für das Phenyläthanolamin gelten

* *Riedel-De Haen.*

lassen, denn die Parallelen gehen noch weiter. TAINTER[68] hat darauf hingewiesen, daß bei Hunden und Katzen nach Phenyläthanolamin subkutan keine Blutdrucksteigerung eintritt. Ich konnte das bei Blutdruckmessungen an 2 Ratten bestätigen. Es ist bekannt, daß das Adrenalin subkutan bei Tieren im Gegensatz zum Menschen meist auch keine Blutdrucksteigerung hervorruft (TRENDELENBURG[79]). Dabei ist nun die Beobachtung von STARKENSTEIN und WEDEN[80] für die vorliegende Betrachtung wichtig, daß das Adrenalin vom subkutanen Depot aus nicht grundsätzlich unwirksam ist, sondern daß es mit starken individuellen Schwankungen auch beim Kaninchen zu Blutdrucksteigerungen kommen kann. Denn das deutet in unserem Fall darauf hin, daß die individuelle Verschiedenheit der Resorption auch hier außerordentlich groß sein könnte.

Der Hinweis auf die Parallelen zwischen Adrenalin und Phenyläthanolamin darf natürlich nicht so verstanden werden, als gäbe es nicht auch erhebliche pharmakologische Unterschiede zwischen diesen Aminen. Aber es verdient betont zu werden, daß es sich um keine grundsätzlich neue Annahme handelt, wenn bei verschiedener Applikationsweise eines Amins verschiedene Wirkungen in den Vordergrund gerückt werden. Solchen verschiedenen Wirkungen des Phenyläthanolamins entsprechen vermutlich die verschiedenen Neigungen der beiden Letalitätsgeraden. Zusammenfassend darf man die Effekte wohl so umreißen, daß bei intravenöser Injektion der Tod die Folge eines ganz akuten Kreislaufversagens ist, bei subkutaner Anwendung dagegen resorptionsverzögernde Lokalreaktionen auftreten, und der Tod einem vielleicht zentral geförderten Lungenödem folgt. Daß die Resorptionsverzögerung gerade beim Phenyläthanolamin eine besonders große Rolle spielen muß, geht aus den Abständen der beiden mittleren tödlichen Dosis hervor. Denn die LD 50 ist bei subkutaner Injektion > 2000 mg/kg, bei intravenöser 280 mg/kg Phenyläthanolaminsulfat.

b) Pervitin. Die Beobachtung der Gefäßreaktion und das Intervall bei den Todeszeiten der intravenös mit Pervitin gespritzten Tiere deutet darauf hin, daß die Todesursache einmal eine akute Kreislaufstörung, das andere Mal eine zentrale Lähmung ist; etwa $^2/_3$ der Ratten sterben durch das rasche Versagen des Kreislaufs. Bei subkutaner Reaktion dagegen verursacht wohl stets die zentrale Lähmung den Tod. Außerdem besteht subkutan eine starke lokale Wirkung.

Daß das Pervitin zwei ganz getrennte Angriffspunkte besitzt, beschreibt bereits HAUSCHILD[57]. Die Kreislaufbeeinflussung des Pervitins ist eine periphere Wirkung, auch an der dekapitierten Katze voll vorhanden, und schon mit wenigen γ zu erreichen. Infolgedessen hat diese Wirkung nichts mit dem zentralen Effekt zu tun.

Die Verschiedenheit der beiden Variationsgrößen ist also als Ausdruck für verschiedene pharmakodynamische Prozesse durchaus erklärlich. Aber beim Pervitin besteht noch die besondere Beziehung zwischen den beiden Letalitätsgeraden, die sehr ungewöhnlich sein dürfte, daß die beiden Geraden sich schneiden. Das bedeutet, daß es einen Dosenbereich geben muß, in dem bei intravenöser Injektion kein Tier mehr gefährdet wird, während die gleiche Dosis subkutan gegeben noch einen ganz geringen Prozentsatz von Tieren tötet. Daß eine subkutane Injektion gefährlicher sein kann als eine intravenöse Gabe der gleichen Substanz, ist eine eigenartige Konsequenz. Sie würde nahelegen, daß mit den verschiedenen Wirkungen auch ein verschiedener Umbau oder Abbau des Pervitinmoleküls verknüpft ist. Es wäre wert, die größere Gefährdungsbreite in diesem Dosenbereich bei subkutaner Injektion direkt experimentell zu prüfen. Aber das würde viele hundert oder gar einige tausend Tiere für ein statistisch sicheres Ergebnis erfordern. Denn man muß sich klar sein, daß zur Festlegung von einem Wirkungsprozent das Vielfache an Tiermaterial erforderlich ist wie zur Bestimmung einer Wirkung bei 50% der Tiere. Andererseits muß man zugeben, daß aus diesem Grunde noch nicht genau bekannt ist, wieweit die Letalitätslinien an ihren Enden wirklich immer als Gerade verlaufen, oder ob Abweichungen vom geraden Verlauf in diesem Bereich häufig sind[81]. Immerhin wäre das beim Pervitin denkbar.

Die Konsequenz sei noch von der praktischen Seite beleuchtet. Die Neigung der Letalitätsgeraden ist auch ein Maß für die Gefährdungsbreite einer Substanz[4]. Wenn man Neosalvarsan injiziert, das eine steile Letalitätskurve hat, ist zu erwarten, daß die Hälfte der LD 50 nur noch 1 von 10000 Tieren tötet*. Um für Pervitin die gleiche Sicherheit zu haben, dürfte man intravenös nur etwa $^1/_4$ und subkutan $^1/_{30}$ der LD 50 injizieren, das wären ungefähr 12 bzw. 6 mg/kg Pervitin-HCl.

Daß die Toxizitätsbestimmungen von Pervitin mit besonderen Unsicherheitsfaktoren verbunden sind, ist auch sonst aufgefallen. Schon HAUSCHILD[57] hat darauf hingewiesen, daß die tödlichen Dosen um 100% schwanken können und daß sie im Winter anders liegen als im Sommer. Seine Versuche sind an 500 Ratten bei intraperitonealer Injektion durchgeführt, allerdings wohl nicht nach modernen Gesichtspunkten ausgewertet worden. CHANCE[32] hat kürzlich untersucht, wie man die Variation nach Pervitininjektionen bei Mäusen vermindern kann. Selbst bei physiologischen Versuchen an Menschen wurde die Variabilität betont (CUTHBERTSON und KNOX[82]), wobei besonders interessant ist, daß die Wirkung für das Einzelindividuum jeweils eine konstante Größe blieb. Auch aus einem Vergiftungsfall beim Menschen kann man entnehmen, daß die Streuung der Wirkung ungewöhnlich groß ist, und daß die Beachtung der Neigung der Letalitätsgeraden durchaus praktisches Interesse hat. Denn ein junger Mann bekam nach 12 mg Pervitin oral bereits schwere Vergiftungserscheinungen (AGNOLI und GALLI[83]).

---

* Der Logarithmus der Dosis, die nur 1 von 10000 tötet, ist log LD 50—3,72 λ. Die 3,72fache Standardabweichung entspricht der Häufigkeit 1:10000.

Das Ergebnis der vorliegenden Pervitinversuche kann man wohl so zusammenfassen, daß sich bei 21° die mittleren tödlichen Dosen nach subkutaner und intravenöser Injektion etwa wie 4 : 1 (190 mg/kg : 45 mg/kg) verhalten, während sich das Verhältnis bei hochempfindlichen Tieren dem Wert 1 : 1 nähert. Der Tod der Tiere ist bei intravenöser Injektion meist eine Folge der Kreislaufwirkung, bei subkutaner Injektion dagegen eine Folge der zentralen Wirkung des Pervitins. Es kann aber nicht entschieden werden, ob beim Pervitin der größere Teil der subkutanen Variabilität auf das Konto des variablen zentralen Effektes kommt oder auf die individuelle Verschiedenheit der Resorption. Ferner ist sicher, daß eine Dosis Pervitin, subkutan bei 32 gegeben, für Ratten viel gefährlicher ist, als die gleiche Dosis bei 21° intravenös injiziert.

Das Hervortreten der beiden verschiedenen Angriffspunkte des Pervitins legt die Vermutung nahe, daß die Kreislaufwirkung und der zentrale Effekt von verschiedenen Eigenschaften des Pervitinmoleküls abhängen könnten. Diese Frage läßt sich jedoch zunächst nicht beantworten, obwohl die Tatsache dazu verlockt, daß das besonders zentral wirksame Pervitin ($[\alpha]_D^{20} = 17^0$) und das Dexedrin (d-Benzedrin) rechtsdrehend sind, während die übrigen, vor allem am Kreislauf angreifenden Adrenalin-Ephedrinkörper links drehen. Man muß aber bedenken, daß es sich trotz der verschiedenen optischen Drehungen nicht einfach um optische Antipoden handelt; denn die l-Konfiguration hängt von dem hydroxyltragenden β-Kohlenstoffatom ab, die Rechtsdrehung dagegen von dem mit dem Stickstoff verbundenen α-C-Atom. Offenbar ist aber diese bestimmte Konfiguration am α- und β-C-Atom eine Bedingung für die optimale pharmakodynamische Gesamtaktivität, also für die Kreislauf- *und* die zentrale Wirkung. So erfüllt das l-Ephedrin beide sterischen Bedingungen (Konzett[84]); es ist (peripher) am Kreislauf und zentral wirksam. d-Pseudo-Ephedrin hat nur am α-C-Atom die gleiche sterische Konfiguration und wirkt sowohl peripher schwächer (Chen u. Mitarb.[85]) als auch zentral (von Brücke[86]). Beim Veritol, Benzedrin und Pervitin fehlt die alkoholische Hydroxylgruppe und damit das eine Asymmetriezentrum. Für die optimale Aktion bleibt aber die d-Konfiguration am α-Kohlenstoff weiterhin Bedingung. So ist das d-Veritol aktiver als sein Antipode (Rein[87]), jedenfalls am Kreislauf. d-Pervitin wirkt nicht nur zentral, sondern auch peripher stärker als l-Pervitin, wie aus der Arbeit von Konzett[84] zu entnehmen ist. Um die Frage nach der Wirkungsweise der optischen Isomeren des Pervitins an ihren verschiedenen Angriffspunkten zu klären, ist also noch experimentelle Arbeit erforderlich.

C. Weitere Bedingungen für verschiedene Dosiswirkungskurven bei einer Substanz.

Eingangs wurde festgestellt, daß die Variationsbreite, die durch die Neigung einer Letalitätskurve gemessen wird, eine so eigentümliche, charakteristische Größe für jedes Pharmakon ist, daß man gesetzmäßige Beziehungen zur chemischen Konstitution feststellen konnte. Trotzdem war es möglich, für eine Substanz verschiedene Variationsgrößen zu

finden, wenn ihr verschiedene pharmakologische Effekte zukamen. Phenyläthanolamin und Pervitin hatten differente Wirkungen bei verschiedener Applikationsweise. Aber auch unter anderen Bedingungen kann eine Substanz verschiedene Effekte haben. So kann sich die Vergiftung durch ein Pharmakon bei jungen und alten Tieren qualitativ unterscheiden, wie das folgende Beispiel zeigt.

SCHLOSSMANN[28] hat 1937 Untersuchungen über die Wirkung des Atropins und des Morphins bei Kaninchen verschiedenen Alters durchgeführt. Bei jungen Kaninchen wirkte Atropin zunächst narkotisch mit Verlangsamung der Atmung, dann traten langdauernde Krämpfe auf. Der Tod kam mit dem Atemstillstand. Bei den erwachsenen Tieren dagegen erhöhte sich die Atem- und Pulsfrequenz und das Leben endete in einem terminalen Krampf. Die LD 50 betrug bei den jungen Tieren 0,225 g/kg Atropinsulfat, bei den alten dagegen 0,35 g/kg. Stellt man graphisch die Neigung der Letalitätsgeraden fest, so findet man im 1. Fall $\lambda = 0{,}1$, bei den älteren Kaninchen dagegen $\lambda = 0{,}26$. Das heißt also, daß den qualitativ verschiedenen Wirkungen auch verschiedene Variationsgrößen entsprachen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Morphinuntersuchungen. Auch hier war die Differenz der LD 50 zwischen jungen und alten Tieren im Sinne der höheren Empfindlichkeit der jungen vorhanden. Aber die pharmakologische Wirkung war in beiden Altersklassen qualitativ gleich. Dem entsprach eine gleichartige Neigung der beiden Letalitätsgeraden. (Man sehe nach den Zahlen des Autors, nicht nach seiner graphischen Darstellung, die durch Einbeziehung der Punkte mit zu kleiner Tierzahl verzerrt erscheint.)

Wahrscheinlich ließen sich noch weitere, ähnliche Beispiele in der Literatur finden. Es ist aber nicht anzunehmen, daß das hier geschilderte Naturgesetz nur auf Letalitätsbestimmungen angewendet werden kann. Die gleiche Gesetzmäßigkeit dürfte vielmehr auch für andere Alles-oder-Nichts-Reaktionen gelten. Bei geeigneter Wahl der Reaktionskriterien kann man sicherlich für jeden pharmakologischen Effekt eine Dosiswirkungskurve aufnehmen. So hat FOSTER[81] für Phenyläthylbarbitursäure nicht nur die Letalitätskurve bestimmt, sondern auch die Dosis-Narkosekurve. Dabei zeigte sich für beide Kurven eine etwas verschiedene Neigung. Ich möchte daraus folgern, daß der Narkoseeffekt und die tödliche Vergiftung jeweils auf etwas anderen Vorgängen beruhen müssen. Solche Art der Schlußfolgerung kann sicherlich in vielen Fällen angewendet werden. Die Möglichkeit, aus dem Kurvenverlauf etwas über pharmakodynamische Vorgänge auszusagen, dürfte von theoretischem und auch praktischem Wert sein.

Prinzipiell von gleicher Bedeutung ist es, wenn die Letalitätsgerade einen Knick aufweist. Bereits BLISS[88] sah darin ein Zeichen für eine qualitativ verschiedene Wirkung einer Droge bei hoher und niedriger Konzentration.

[Ein unregelmäßiger Kurvenverlauf kann freilich noch die andere Ursache haben, daß in einem Tierkollektiv 2 Tiergruppen mit deutlich verschiedener Empfindlichkeit vorhanden sind (TREVAN[2]; BIEHLER und WOLLSCHMITT[89]). Das hieße z. B., daß bei einer bestimmten Dosis einer Substanz sämtliche Weibchen eingehen, aber erst ein Bruchteil der Männchen.]

D. Die theoretische Deutung des Kurvenverlaufs.

Sicherlich herrscht Einigkeit in der Auffassung, daß die biologische Variation höherer Lebewesen in den Dosisletalitätskurven mehr oder weniger stark zum Ausdruck kommt. Es steht aber zur Diskussion, ob der Kurvenverlauf ausschließlich durch die Variation bestimmt ist, oder ob die Form der Kurven im wesentlichen durch den Ablauf chemischer oder physikalischer Vorgänge geprägt wird, wobei der Variation nur ein modifizierender Einfluß zukäme.

Daß diese Kurven ausschließlich ein Ausdruck für die Variation seien, entspricht Gaddums Auffassung[3, 90]. Clark[4, 91] meinte, daß die Kurven durch die Art der chemischen oder chemisch-physikalischen Bindung der Droge an der oder in der Zelle bestimmt sind und durch die individuelle Variation lediglich etwas verzerrt werden. Die trefftheoretische Deutung der Sterblichkeitskurven höherer Tiere (z. B. Jordan[92], v. Schelling[93]) braucht hier nicht diskutiert zu werden. Denn wie Timoféeff-Ressovski und Zimmer[47] gezeigt haben, sind Trefferkurven im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz gekrümmt, während die Letalitätslinien im allgemeinen gerade verlaufen.

Aus den vorliegenden Beobachtungen ergeben sich 2 Argumente gegen Clarks Auffassung: 1. Wenn die Art der Fixation an der Zelle für die Form der Kurve entscheidend wäre, müßte man wohl für das Phenyläthanolamin eine grundsätzlich andere Weise der „Bindung an den Herzmuskel" gegenüber der „Bindung an den peripheren Gefäßmuskel" annehmen, entsprechend den verschiedenen pharmakologischen Effekten bei intravenöser bzw. subkutaner Anwendung. Solche Annahme ist aber durch nichts gerechtfertigt. 2. Trevan, Gaddum und Clark waren davon überzeugt, daß die Neigung der Kurve ein charakteristischer Wert für jede Substanz sei, wie eingangs dargelegt. Das trifft auch sicher insofern zu, als jedem Pharmakon eine eigentümliche Wirkung zukommt, wie das Beispiel über die Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Variation zeigt. Aus den experimentellen Befunden folgt aber, daß hier dem Begriff der Wirkung besonderes Gewicht beizumessen ist. Das heißt also, daß die Letalitätskurven nicht so sehr charakteristisch für ein Pharmakon als vielmehr für eine bestimmte pharmakologische Wirkung sind. Sonst könnten ja nicht 2 verschiedene Letalitätskurven bei einer Substanz vorkommen. Unter der pharmakologischen Wirkung muß in diesem Zusammenhang die ganze Fülle mehr oder weniger verknüpfter Vorgänge verstanden werden, die durch die wirksame Substanz direkt oder indirekt ausgelöst werden kann. Kaum ein Pharmakon hat einen so isolierten Angriffspunkt, daß nicht außer der Hauptwirkung auch Nebenwirkungen auftreten. Die meisten Pharmaka haben mehrere Angriffspunkte im höheren Organismus. Weiter muß man sich vorstellen, daß die

biologischen Substrate der Pharmaka innerhalb des Organismus weitgehend getrennt für sich variieren können; nur zum Teil wird eine Korrelation zwischen den Variationen der einzelnen anatomischen, chemischen oder funktionellen Einheiten im Lebewesen bestehen. Die Letalvariation stelle ich mir also als Summe der Variationen von Faktoren vor, die primär oder sekundär durch das Gift beeinflußt sind. Diese Einzelvariationen dürften sich gegenseitig verstärken und zum Teil auch aufheben (vgl. GÜNTHER[94]). Auf diese Weise muß es geschehen können, daß die Form einer Konzentrationsfixationskurve in der Letalkurve kaum noch zum Ausdruck kommt. Die Wirkung eines Arzneimittels und die biologische Variation höherer Lebewesen sind also so komplexe Größen, die hier zueinander in Beziehung treten, daß die Deutung der Letalitätskurven auf physikalisch-chemischer Grundlage nicht sehr erfolgsversprechend sein kann, solange diese Größen nicht genauer analysiert sind.

Die funktionelle und anatomische Variation der Individuen ist also der bestimmende Faktor für den Verlauf der Dosisletalitätskurven bei höheren Lebewesen. Diese Variation läßt sich weder durch Inzucht noch durch gleichmäßige Lebensbedingungen beseitigen, genau so wenig, wie eine Letalitätsgerade nie senkrecht verlaufen wird. Ferner sind auch die normalen Variationen durchaus nicht gleich groß. Als ein für die vorliegende Fragestellung vielleicht etwas plumpes, dafür aber jedem geläufiges Beispiel sei angeführt, daß die Körpergröße gesunder, erwachsener Menschen kaum um 30% variiert, das Gewicht nicht so selten um 100% und mehr. Dieses stärkere Abweichen des Körpergewichts wurde durch v. VERSCHUER[95] auch in der Zwillingsforschung bestätigt. Pigmente in Haut und Haaren, sekundäre Geschlechtsmerkmale, wie die mammae sind variabler als Hände und Füße. Das Gewicht des Herzens variiert stärker als das anderer Organe (PEARL[96]). Beim Flußkrebs variieren die differenziertesten Gebilde am stärksten (PEARL und CLAWSON[97]). Von der Kapillarmikroskopie ist nicht nur bekannt, daß das Kapillarbild anatomisch und funktionell von Individuum zu Individuum stark schwanken kann (O. MÜLLER[98]), vielmehr ist die Häufigkeit der normalen Bilder und der Abweichungen auch zahlenmäßig belegt (SCHILLER[99]). Über die normale Variation feinerer Gebilde oder gar von Fermenten weiß man jedoch noch kaum etwas (CURTIUS[100]). Zur Kenntnis der normalen Variation ist also noch viel Arbeit zu leisten. Wegen der Meßbarkeit der pharmakologischen Variation sollte man diese noch mehr als bisher systematisch für die Konstitutionslehre ausnutzen.

Bei der Giftwirkung an höheren Organismen steht die Variation für die Gestaltung der Dosiseffektkurven im Vordergrund, wie ich zu zeigen versucht habe. Dagegen sind an den kleinsten biologischen Ein-

heiten (Bakterien, Zellen) und bei Strahlenanwendung, wobei die Faktoren der Resorption und des Durchwanderungsvermögens durch Zellmembranen wegfallen, die Dosiswirkungskurven auf physikalischer Basis mit Hilfe der Treffertheorie deutbar. Die biologische Variation spielt dabei zum Teil eine so geringe Rolle, daß sie lange Zeit in erster Näherung vernachlässigt werden konnte. Es ist denkbar, daß es Zwischenstufen zwischen diesen beiden extremen Fällen gibt. Eine Abtrennung der beiden Bereiche gehört jedoch auf den meisten Gebieten zu den Aufgaben der Zukunft.

Zusammenfassung.

1. Die Neigung von Dosisletalitätskurven hängt in besonderer Weise von dem angewandten Gift ab. Der Neigungswinkel ist so charakteristisch, daß sich bei einer homologen Reihe von Adrenalinverwandten gesetzmäßige Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Neigung der Letalitätskurven feststellen ließen. Die Neigung wird nach Gaddum durch die normale äquivalente Abweichung im logarithmischen Maßstab gemessen.

2. Phenyläthanolamin und Pervitin haben bei subkutaner Anwendung an Ratten jeweils flachere Letalitätskurven als bei intravenöser Injektion. Dem entsprechend stehen bei verschiedener Applikationsweise dieser Amine jeweils verschiedene pharmakodynamische Effekte im Vordergrund.

3. Daraus ist zu folgern, daß die Neigung der Kurven bei höheren Tieren durch die Variation des Tiermaterials bedingt wird und nicht durch die Art der Bindung des Giftes in der Zelle (Clark); auch die Treffertheorie ist nicht zur Deutung dieser Kurven geeignet. Die Variation ist also eine für jede pharmakologische Wirkung naturgesetzlich eigentümliche, charakteristische Größe.

Herrn Professor Schroeder danke ich für die Durchsicht des mathematischen Teils der Arbeit. Der Firma *Riedel-de Haen*, Berlin-Britz, bin ich für das Phenyläthanolamin (Norphedrin) und den *Temmler-Werken*, Berlin-Johannisthal, für das Pervitin zu Dank verpflichtet.

Literatur.

[1] Shackell, L. F.: J. gen. Physiol. (Am.) **5**, 783 (1923. — [2] Trevan, J. W.: Proc. roy. Soc., Lond. B **101**, 483 (1927). — [3] Gaddum, J. H.: Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser. **183** (1933). — [4] Clark, A. J.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Werk, Bd. IV. Berlin 1937. — [5] Hazen: Trans. amer. Soc. liv. Engineers **77**, 1539 (1914). — [6] Bliss, C. I.: Ann. appl. Biol. **22**, 134, 307 (1935). — [7] van der Waerden, B. L.: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 389 (1940). — [8] Prigge, R., u. W. Schäfer: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 281 (1939). — [9] Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin 1937. — [10] Linder, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure. Basel 1945. — [11] Behrens, S., u. G. Kärber: Arch. exper. Path. (D.) **177**, 379 (1935). —

[12] KÄRBER, G.: Arch. exper. Path. (D.) **162**, 480 (1931). — [13] SCHELLING, H. v.: Arb. Staatsinst. exper. Ther. usw. Frankfurt. M. **37**, 28 (1939). — [14] PRIGGE, R.: Naturw. **25**, 169 (1937). — [15] CLOPPER, C. S., and E. S. PEARSON: Biometrika (Brit.) **26**, 404 (1934. — [16] SCHELLING, H. v.: Naturw. **25**, 699 (1937). — [17] LUDWIG, W.: Naturw. **25**, 459 (1937). — [18] PRIGGE, R.: Z. Hyg. **119**, 187 (1937). — [19] WINTON, F. R.: J. Pharmacol. (Am.) **31**, 123 (1927). — [20] NICHOLAS, J. S.: J. Pharmacol. (Am.) **46**, 125 (1932). — [21] POE, C. F., J. F. SUCHY and N. F. WITT: J. Pharmacol. (Am.) **58**, 239 (1936). — [22] MOIR, W. M.: J. Pharmacol. (Am.) **59**, 68 (1937). — [23] CRABTREE, D. G., J. C. WARD and J. F. WELCH: Endocrinology (Am.) **25**, 629 (1939). — [24] HOLCK, H. G. O., M. A. KANÂN, M. MILLS and E. L. SMITH: J. Pharmacol. (Am.) **60**, 323 (1937). — [25] DURHAM, F. M., J. H. GADDUM and J. E. MARCHAL: Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser. **128**, 1929. — [26] BEHRENS, B., u. E. REICHELT: Z. exper. Med. **91**, 417 (1933). — [27] SCHLOSSMANN, H.: Arch. exper. Path. (D.) **163**, 588 (1932). — [28] SCHLOSSMANN, H.: J. Pharmacol. (Am.) **60**, 14 (1937). — [29] KENNEDY, W. P.: J. Pharmacol. (Am.) **50**, 347 (1934). — [30] LAMBRUSCHINI, C.: C. R. Soc. Biol. **129**, 1213 (1939). — [31] POKROWSKI, W. A.: J. Pharm. a. Toxicol. (USSR.) **3**, 53 (1940). Ref. Chem. Zbl. **1942** II, 1371. — [32] CHANCE, M. R. A.: J. Pharmacol. (Am.) **89**, 289 (1947). Ref. Chem. Abstr. **41**, 3532 (1947). — [33] LESER, A. J., C. H. THIEMES and D. B. TYLER: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **45**, 682 (1940). — [34] HERRMANN, J. B.: J. Pharmacol. (Am.) **72**, 130 (1941). Ref. Chem. Z. **1943**, 1646. — [35] ELLIOTT, H. W., and J. M. CRISMON: Amer. J. Physiol. **151**, 366 (1947). — [36] SIEVERS, R. F. and A. R. MC. INTYRE: J. Pharmacol. (Am.) **59**, 90 (1937). — [37] MCDONALD, F. F.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 116 (1948). — [38] MEYER, B. J., and L. KAREL: J. Pharmacol. (Am). **93**, 420 (1948). — [39] HJORT, A. M., E. J. DE BEER and D. W. FASSETT: J. Pharmacol. (Am.). **65**, 79 (1939). — [40] CHIANCONE, F. N.: Pharmaco. sci. e tec. **1**, 401 (1946). — [41] MORRELL, C. A., and C. W. CHAPMAN: J. Pharmacol. (Am.) **48**, 391 (1933). — [42] TREVAN, J. W.: J. Path. a. Bacter. **32**, 127 (1929). — [43] SCHULTZ, W. H.: U. S. Hyg. lab. Bull. **55** (1909). Zit. nach CLARK[4] S. 157 u. 175. — [44] DREYER, G., and M. L. CAMPBELL-RENTON: Proc. Roy. Soc., Lond. B. **120**, 447 (1936). — [45] RAHN, O.: J. gen. Physiol. (Am.) **13**, 179, 395 (1930). — [46] SCHUBERT, H.: Siehe FIAT Review, Bd. 64, S. 3—9. — [47] TIMOFÉEFF-RESSOVSKI, N. W., u. K. G. ZIMMER: Das Trefferprinzip in der Biologie, Leipzig 1947. — [48] PRIGGE, R.: Z. Hyg. **119**, 186 (1937). — [49] DE BEER, E. J., A. M. HJORT and C. A. COOK: J. Pharmacol. (Am.) **65**, 46 (1939). — [50] MCCALLAN, S. E. A., and F. WILCOXON: Contribut. Boyce Thompson Inst. **3**, 13, 31 (1931). Zit. nach CLARK (4) S. 162. [51] LANDS, A. M., V. L. NASH, B. L. DERTINGER, GRANGER and H. M. MCCARTHY: J. Pharmacol. (Am.) **92**, 396 (1948). — [52] KONZETT, H.: Arch. exper. Path. (D.) **197**, 41 (1941). — [53] MARSH, D. F, M. H. PELLETIER and C. A. ROSS: J. Pharmacol. (Am.) **92**, 108 (1948). — [54] MARQUARDT, P., u. R. KOCH: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 658 (1943). — [55] ALLES: J. Pharmacol. (Am.) **32**, 121 (1928). — [56] HEUBNER, W. u. M. STUHLMANN: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 594 (1943). — [57] HAUSCHILD, F.: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 465 (1939). — [58] LUMIÈRE, A., et P. MEYER: C. r. Soc. Biol. **128**, 680 (1938). — [59] NYIRI, W., and L. DUBOIS: J. Pharmacol. (Am.) **36**, 635 (1929). — [60] LATVEN, A. R. and H. MOLITOR: J. Pharmacol. (Am.) **65**, 89 (1939). — [61] WALTON, R. P., C. B. PREACHER and W. M. CANNON: J. Pharmacol. (Am.) **92**, 214 (1948). — [62] WHITHE, A. C., and E. STEDMAN: J. Pharmacol. (Am.) **60**, 191 (1937). — [63] CHEN, K. K.: J. Pharmacol. (Am.) **27**, 61 (1926). — [64] KOLSHORN: Ber. dtsch. Chem. Ges. **37**, 2474 (1904). — [65] BARGER, G., and H. H. DALE: J. Physiol. (Brit.) **41**, 19 (1910). — [66] TAINTER, M. L.: J. Pharmacol. (Am.) **33**, 129 (1928). — [67] MILLER, H., and G. PINESS: J. amer. med. Assoc. **91**, 1033 (1928). — [68] TAINTER, M. L.: J. Pharmacol. (Am.) **36**, 29 (1929). — [69] BUN-ICHI, HASAMA: Arch. exper. Path. (D.) **153**, 161 (1930). — [70] CRISMON, J. M., and

M. L. Tainter: J. Pharmacol. (Am.) **66**, 146 (1939). — [71] Morton, M. C., and M. L. Tainter: J. Physiol. (Brit.) **98**, 263 (1940). — [72] Werner, W.: Z. inn. Med. **3**, 92 (1948). — [73] Rosenkranz, S.: Arch. exper. Path. (D.) **189**, 568 (1938). — [74] Luisada, A.: Arch. exper. Path. (D.) **132**, 313 (1928). — [75] Jarisch, A., u. H. Thoma: Klin. Wschr. **1940**, 76. — [76] Riechert, W., u. H. Schmieder: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 121 (1941). — [77] Emmert, J.: Virchows Arch. **194**, 114 (1908). — [78] Delaunay, A., M. Delaunay et J. Lebrun: C. r. Séances Acad. Sci. **227**, 315 (1948). — [79] Trendelenburg, P.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II, 2, S. 1175. — [80] Starkenstein, E., u. H. Weden: Med. Klin. **1934**, 1711. — [81] Foster, R. H. K.: J. Pharmacol. (Am.) **65**, 1 (1939). — [82] Cuthbertson, D. P., and J. A. C. Knox: J. Physiol. (Brit.) **106**, 42 (1947). — [83] Agnoli, R., u. T. Galli: Slg. Vergift.fälle **10**, 173 (1939). — [84] Konzett, H.: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 345 (1941). — [85] Chen, K. K., Chang-Keng Wu and E. Henriksen: J. Pharmacol. (Am.) **36**, 363 (1929). — [86] Brücke, F. Th. v.: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 100 (1941). — [87] Rein, H.: Arch. exper. Path. (D.) **187**, 617 (1937). — [88] Bliss, C. I: J. Econ. Entomol. **28**, 646 (1935). Zit. nach Foster[81]. — [89] Biehler, W., u. H. Wollschmitt: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 278 (1941). — [90] Gaddum, J. H.: Proc. roy. Soc. Lond. B **121**, 598 (1937). — [91] Clark, A. J.: Proc. roy. Soc., Lond. B **121**, 580 (1937). — [92] Jordan, P.: Naturw. **29**, 89 (1941). — [93] Schelling, H. v.: Naturw. **30**, 306 (1942). — [94] Günther, H.: Die Variabilität der Organismen, Leipzig 1935. — [95] Verschuer, v.: Zit. nach Curtius[100]. — [96] Pearl, R.: Medical Biometry and Statistics, Philadelphia 1923. [97] Pearl, R., and A. B. Clawson: Carnegie Institution of Washington, Publication No 64. Washington 1907. — [98] Müller, O.: Die feinsten Blutgefäße des Menschen in gesunden und kranken Tagen, Bd. I, 1937, Bd. II, 1939. Stuttgart. — [99] Schiller, M.: Z. Neur. **151**, 700 (1934). — [100] Curtius, F.: Handbuch der inneren Medizin, Bd. VI/2, S. 1—342, Berlin 1944.

Dr. Werner Kalow, Berlin-Dahlem, Garystr. 9,
Pharmakolog. Inst. der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 324—333 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über intrazelluläre Verschiebung der Wasserstoffzahl.

XXXI. Mitteilung.

Studien über Methämoglobinbildung.

Von

Wolfgang Heubner und Hildegard Weist*.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Januar 1949.)

I.

Es ist bekannt, wie weitgreifende Regulationseinrichtungen im Organismus wirksam sind, die eine relativ hohe Konstanz der Wasserstoffzahl des Blutes aufrechterhalten. Doch gibt es manche Anhaltspunkte für die verbreitete Meinung, daß in den Zellen der Gewebe Unterschiede der „Säuerung" bestehen können, daß in *diesem* Sinne z. B. die Katze ein saures, das Kaninchen ein alkalisches Tier ist, daß in *diesem* Sinne eine „saure" oder „basische" Diät von Bedeutung sein könne und dergleichen mehr.

Ein unmittelbarer Nachweis von Reaktionsverschiebungen innerhalb der Zellen eines lebenden Körpers ist schwer zu erbringen. Erst recht ist das Ausmaß dieser Verschiebungen schwer zu beurteilen und so bleiben von subjektiven Schätzungen die Antworten auf die Frage abhängig, wie weit die angenommenen Verschiebungen intrazelluläre Umsetzungen beeinflussen können.

Eine bequem zu messende Umsetzung liegt vor in der Umwandlung des Chlorats in seine wirksamen Reduktionsprodukte, vor allem wohl Hypochlorit. Denn diese labilen Oxydationsmittel reagieren unmittelbar mit dem Blutfarbstoff unter Bildung von Hämiglobin [Hb(3), Methämoglobin], während das stabile Chlorat dazu nicht imstande ist; man kann also die am Chlorat eintretende Umwandlung an der Bildung des Hb (3) erkennen, selbst messen.

Es ist heute sichergestellt, daß die Umwandlung des auf den Blutfarbstoff wirkenden Chlorats nur im Inneren der Blutzellen vor sich geht. Besonders beweisend dafür ist die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit in verschiedenen Arten der Erythrozyten desselben Blutes, nämlich solchen verschiedenen Gewichtes, vermutlich verschiedenen Alters (vgl. dazu Nickel[1], Jung[2], Viezens[3]). Dies hängt

* Vgl. auch die Dissertation von Hildegard Weist, Berlin 1948: „Die Abängigkeit der Hämiglobinbildung von der Wasserstoffionenkonzentration".

offenbar mit ihrem verschiedenen Gehalt an vorgebildetem (physiologischem) Hb (3) zusammen (Jung). Denn die Reaktion von Chlorat mit Blutfarbstoff, also wahrscheinlich die reduktive Umwandlung des Chlorats, ist abhängig von der Gegenwart kleiner Mengen Hämiglobin als eines spezifischen Katalysators[4].

Nun ist schon viel länger bekannt, daß Hämiglobin bei saurer Reaktion leichter entsteht als bei alkalischer. Für die salpetrige Säure ist dies leicht verständlich, weil sie ja allgemein viel labiler ist als ihr Ion[5]. Aber es gilt auch für das Ferrizyanid-Ion und es gilt für das nicht ionisierte Benzochinon[6].

II.

Für das Chlorat, das als Salz einer starken Säure ebenfalls Ionenform hat, erkannte schon J. v. Mering[7] die Bedeutung der Reaktion, was Patzschke[8] später nochmals bestätigte.

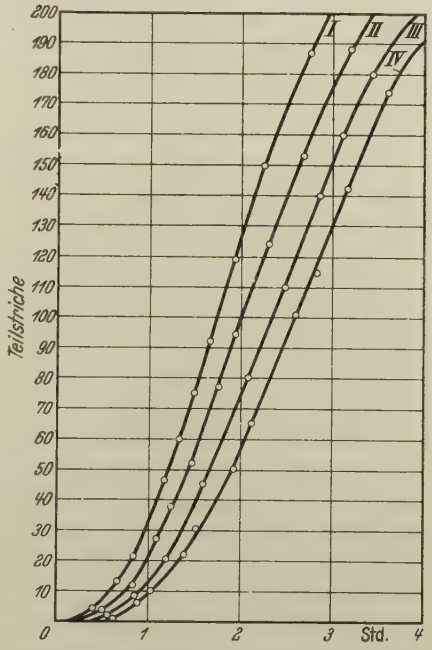


Abb. 1. Bildung von Hämiglobin in vitro. (Ordinate: Größe der Aufhellung im roten Spektralfelde bei Cyanidzusatz); bei O Zusatz von Kaliumchlorat (1 %). p_H bei I = 6,20; II = 6,38; III = 6,63; IV = 6,79.

Wir wiederholten und verfeinerten diese Beobachtungen mit modernerer Methodik: Die Bestimmung der Ausgangswerte von Hb (2) und Hb (3) erfolgte mit dem Havemannschen lichtelektrischen Kolorimeter[9] nach der von Evelyn und Malloy[10], sowie Havemann, Jung und v. Issekutz[11] angegebenen Zyanidmethode, wobei zur Bestimmung des Hb (2) dieses durch Kaliumferrizyanid in Hb (3) überführt wurde. Der zeitliche Verlauf der Hb (3)-Bildung wurde direkt durch die Verdunklung im roten Felde des Spektrums gemessen unter Verwendung der Zeißfilter OG 3 und RG 1 und in Kolorimeterteilstrichen angegeben. Die Konzentration am Blutfarbstoff betrug 0,08%, wovon etwa der hundertste Teil auf Hämiglobin entfiel. Da sich der Extinktionskoeffizient des Hb (3) nach den Arbeiten von I. H. Austin und D. L. Drabkin[12] zwischen p_H 6,0 und 7,0 annähernd konstant verhält, während er außerhalb dieser Werte stark p_H-abhängig ist, wurden die Messungen nur im p_H-Bereich von 6,2—6,8 ausgeführt. Eine Kontrolle der p_H-Werte erfolgte mit der Glaselektrode.

Bereits bei diesen geringen, nur wenige Zehntel betragenden Differenzen der p_H-Werte zeigten sich deutliche Unterschiede in der Hb (3)-Bildung, die bei saurer Reaktion schneller meßbar wird und steiler verläuft (s. Abb. 1).

In 2 weiteren Versuchen wurde der Verlauf der Hb (3)-Bildung durch $KClO_3$ in hämolysierten Blutkörperchenlösungen von bestimmtem p_H eine Zeitlang verfolgt, dann aber die Reaktion eines Teiles der Lösung durch Zusatz von Na_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4, im ersten Fall (Abb. 2) vom Anfangswert p_H 6,2 auf p_H 6,8, im anderen Falle (Abb. 3) von p_H 6,8 auf p_H 6,2 verschoben und die weitere Hb (3)-Bildung verfolgt. Die p_H-Werte wurden vor und nach Zusatz des Phosphats mit

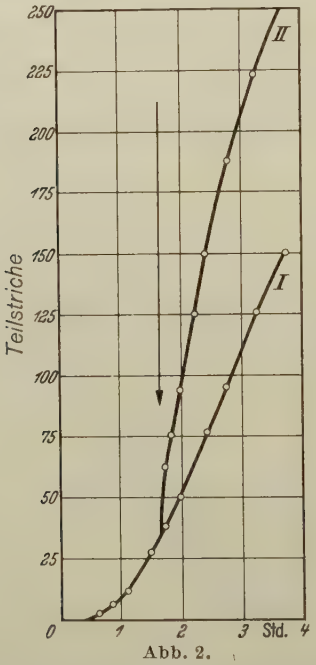


Abb. 2.

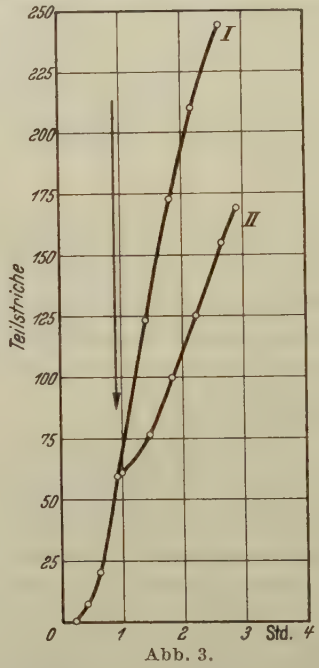


Abb. 3.

Abb. 2 u. 3. Bildung von Hämiglobin durch Chlorat in vitro. pH bei Beginn links 6,8; rechts 6,2 (I); später bei einem Teil des Ansatzes links 6,2; rechts 6,8 (II).

der Glaselektrode bestimmt. Das Blut stammte von dem gleichen Menschen und die Hb- und $KClO_3$-Konzentration war in beiden Versuchen die gleiche wie in der ersten Versuchsreihe. Wiederum zeigte sich eindeutig die schnellere Hb (3)-Bildung bei höherer Wasserstoffionenkonzentration.

Aus den Befunden in vitro ist also zu entnehmen, daß die geringen p_H-Schwankungen des Blutes, wie sie in pathologischen Zuständen, aber auch schon physiologisch vorkommen, bereits genügen, den Ablauf der Hb (3)-Bildung zu beeinflussen.

III.

An lebenden Hunden und Fröschen hatte Masoin[13] die letale Dosis von Anilin, Azetanilid, Nitrit und Chlorat unter Zugabe von Neutral-

salzen oder Bikarbonat (auch Karbonat) bestimmt und ihre Erhöhung (bis zum Doppelten) durch das Alkali ermittelt; an Kaninchen hatte er nach Zufuhr der alkalischen Salze das Ausbleiben der postmortalen Hb (3)-Bildung konstatiert.

Aus äußeren Gründen standen uns als Versuchstiere nur Ratten zur Verfügung. Diese Tiere bieten jedoch die Schwierigkeit, daß sie durch Chlorat nicht vergiftet werden, weil sie physiologisch nicht mit einer ausreichenden Menge des Katalysators Hämiglobin ausgestattet sind. Es ist also erforderlich, ihnen außer Chlorat noch eine zweite hämiglobinbildende Substanz in kleiner Menge zu verabreichen, wie dies bereits Becker, Dordoni und Jung[14] getan hatten.

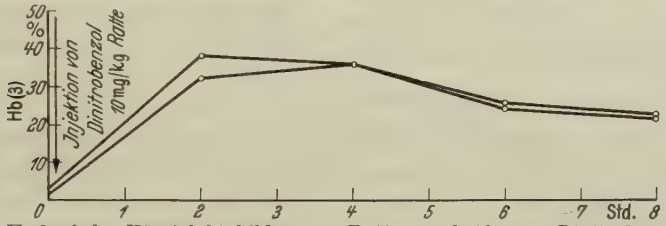


Abb. 4. Verlauf der Hämiglobinbildung an Ratten nach 10 mg m-Dinitrobenzol je kg.

Blutproben wurden jeweils zu 0,04 cm³ aus der Schwanzvene entnommen und ihr Gehalt an Hämiglobin nach dem oben angegebenen Verfahren (S. 325) im Havemann-Kolorimeter bestimmt.

Zunächst erprobten wir Dinitrobenzol, das bei allen Tierarten für eine ziemlich lang hingezogene Zeitdauer im Blute Hb (3) erzeugt.

An 2 Tieren überzeugten wir uns, daß man nach der Dosis von 10 mg je Kilogramm (subkutan in Paraffinöl) von der 6. Stunde an mit einem Abfall des Hämiglobins im Blute, also mit beginnender Elimination des Giftes rechnen kann (vgl. Abb. 4). Daher erschien es zweckmäßig, nach Ablauf von 5 Stunden nach der genannten Gabe Dinitrobenzol Chlorat zu geben. Dies geschah nun an je 3 Tieren, die vorher „sauer" oder „alkalisch" gemacht worden waren.

Die Säuerung oder Alkalisierung der Tiere erfolgte durch täglich zweimalige orale Gaben von 1 g Salmiak in 20%iger oder 0,5 g Natriumbikarbonat in 5%iger Lösung je Kilogramm Körpergewicht für die Dauer von 3 Tagen vor der Vergiftung. Auf das Kilogramm Tiergewicht wurden also mit jeder Dosis 19 Millival saure oder 12 Millival basische Äquivalente zugefügt. Der Harn aller gesäuerten Tiere wies bei der Prüfung mit Lyphanpapier konstant einen p_H-Wert von 5,2—5,6, der der alkalischen Tiere von 7,8—8,2 auf; bei der üblichen Fütterung lag dieser Wert zwischen 6,8—7,2.

Die Dosis Dinitrobenzol blieb mit 10 mg je Kilogramm Tiergewicht die gleiche wie vorher. Die Chloratdosis betrug stets 1 g $KClO_3$ je Kilogramm und wurde in 6%iger Lösung subkutan verabreicht. Die Dosis entsprach etwa dem 270fachen molaren Überschuß gegenüber den Äquivalenten des gesamten Blutfarbstoffs der Tiere unter der Annahme von 6% Blut mit 12,5% Hämoglobin vom Äquivalentgewicht 16800.

Das Ergebnis der Versuche, wie es sich auf Abb. 5 verzeichnet findet, ist eindeutig. Von den alkalisierten Tieren reagierten 2 auf die Chloratgabe nur mit einer sehr geringfügigen Vermehrung des Hämiglobins im Blute, das dritte überhaupt nur mit einer Verzögerung des eingeleiteten Abfalles. Demgegenüber hatten alle 3 gesäuerten Tiere nach $1^3/_4$ Stunden einen um etwa 10% des Blutfarbstoffs höheren Gehalt an Hämiglobin als vor der Chloratgabe, nach $3^3/_4$ Stunden 20, 30 und 40% mehr. Der Durchschnitt der 3 sauren Werte lag also zu diesem Zeitpunkt um 30% des Blutfarbstoffs höher als der der 3 alkalischen Werte, während unmittelbar vor der Chloratgabe — zufällig — die

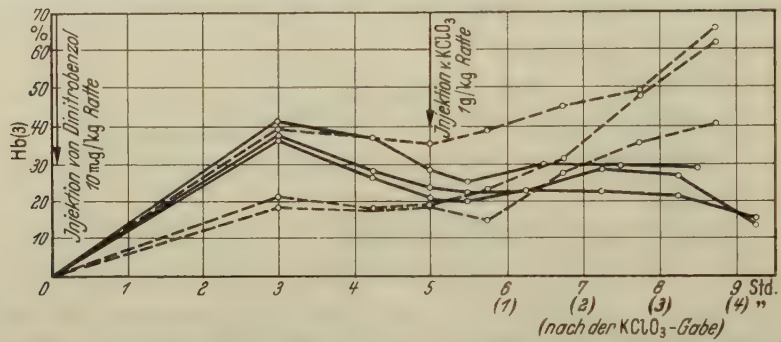


Abb. 5. Je 3 Ratten alkalisch (———) und sauer (— — — —) gefüttert; 5 Stunden nach 10 mg Dinitrobenzol je 1 g Kaliumchlorat je kg. Stärkere Zunahme des Hämiglobins bei den „sauren" Tieren.

Mittel der jeweils 3 Werte (mit 24% des Blutfarbstoffs) genau übereinstimmten. Es ist also nicht zu bezweifeln, daß die Zufuhr des säuernden und des alkalisierenden Salzes die Reaktionsfähigkeit des *inneren Milieus* der Blutkörperchen erheblich verändert hatte: entsprechend der Erwartung verlief der Umsatz des Chlorats bei den „angesäuerten" Tieren schneller.

IV.

Es war anzunehmen, daß diese Veränderung sich auch bei anderen ähnlichen Reaktionen bemerkbar machen würde, wie z. B. bei der Vergiftung mit Nitrit. Auch für dieses Gift ist nach allem, was bekannt ist (vgl. unter anderem Jung und Remmer[15]), die Annahme berechtigt, daß sich die zum Hämiglobin führenden Umsetzungen innerhalb der Blutzelle abspielen. Je 3 Versuche an Tieren, die in der beschriebenen Weise (S. 327) gesäuert oder alkalisiert und danach mit je 30 mg Natriumnitrit subkutan behandelt wurden, ergaben die klaren Befunde, wie sie auf Abb. 6 verzeichnet sind: Das erreichte Maximum der Hämiglobinbildung war bei allen 3 „sauren" Tieren merklich größer als bei den „alkalischen"; nach $1^1/_2$ Stunden betrug der Durchschnitt für die „alkalischen" Tiere 26, für die „sauren" 45% Hb (3).

V.

Komplizierter liegen naturgemäß die Verhältnisse bei gleichzeitiger Applikation von Chlorat und Nitrit. Denn es ist nicht auszuschließen, daß Nitrit oder das aus ihm intermediär entstehende Stickoxyd reduzierend auf das Chlorat einwirken. Die hier mitzuteilenden Befunde sprechen dafür. Daher sind vielleicht auch die von Becker, Dordoni und Jung[14] ermittelten Ergebnisse unter diesem Gesichtspunkt kritisch zu beurteilen. Es ist nicht von vornherein zu sagen, wie lange sich Nitrit noch in den Blutkörperchen befindet und in die Reaktion des Chlorats *unmittelbar* eingreifen kann.

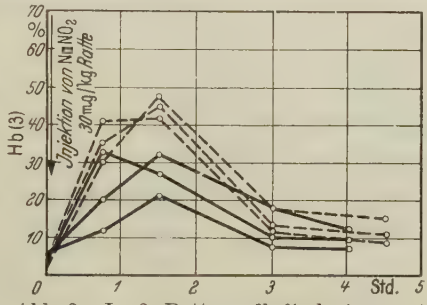


Abb. 6. Je 3 Ratten alkalisch (———) und sauer (— — — —) gefüttert. Hämiglobin nach je 30 mg Natriumnitrit je kg.

Wir verglichen in 2 Versuchsreihen mit je 3 „gesäuerten" und „alkalisierten" Ratten die Effekte von je 1 g Kaliumchlorat nach vorheriger Gabe von je 30 mg Nitrit je Kilogramm. Der Unterschied beider Reihen bestand darin, daß der Zeitabstand zwischen den beiden Giftgaben einmal $1^3/_4$, das andere Mal $2^1/_2$ Stunden betrug. Allerdings hatte sich ohne unser Zutun durch den Zufall der natürlichen Streuung auch ergeben, daß die Wirkung des Nitrits bei der ersten Reihe im Durchschnitt etwas stärker war als bei der zweiten; das Chlorat traf also sowohl einen etwa doppelt so hohen Gehalt an Hämiglobin, wie auch wahrscheinlich einen höheren Gehalt an Nitrit oder seinen Umwandlungsprodukten innerhalb der Blutzellen an. Daher führte es in 2 „sauren" Tieren zu einer *tödlichen* Hämiglobinbildung, während das dritte ebenso wie alle 3 „alkalischen" Tiere am Leben blieb (vgl. Abb. 7).

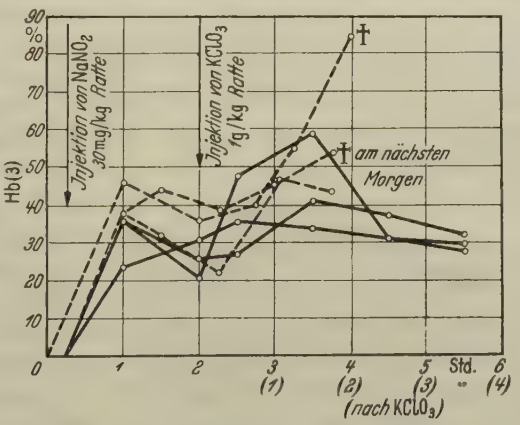


Abb. 7. Drei „alkalische" und 3 „saure" Ratten mit je 30 mg je kg Natriumnitrit, 2 Stunden später mit 1 g je kg Kaliumchlorat behandelt.

In der zweiten Reihe dagegen zeigte sich eine grundsätzliche Annäherung an die Befunde der Abb. 5 (vgl. Abb. 8): Bei allen 3 „sauren"

Tieren zeigte sich nach der Chloratgabe ein deutlicher, wenn auch einmal nur geringfügiger Anstieg des Hämiglobins, während er bei allen 3 „alkalischen" Tieren vollständig vermißt wurde.

Eine weitere ähnliche Versuchsreihe wurde in der Weise ausgeführt, daß zuerst die stets gebrauchte Dosis Chlorat und 1 Stunde danach eine *kleinere* Dosis Nitrit, nämlich 6,9 mg je Kilogramm, verabreicht wurde (vgl. Abb. 9). Der Typus der am Blutfarbstoff eintretenden Wirkung entsprach interessanterweise bei 2 „alkalisierten" Tieren dem reinen Nitriteffekt, insofern das Maximum des Hämiglobins schon $^1/_2$ Stunde nach der Nitritgabe auftrat, um dann einer raschen regelmäßigen Abnahme Platz zu machen; auch bei der dritten Ratte war nach 2 Stunden die Wirkung nahezu abgeklungen. Demgegenüber entsprach der Kurvenverlauf bei den „sauren" Tieren viel eher dem Typus der Chloratwirkung, insofern das Maximum bei 2 Tieren erst 2 Stunden nach der Nitritgabe lag, bei dem dritten 3 Stunden; hier war auch das Ausmaß der Hämiglobinbildung mit beinahe 70% so groß, daß sie keinesfalls auf die kleine Nitritdosis zurückgeführt, sondern nur dem Chlorat zugeschrieben werden konnte.

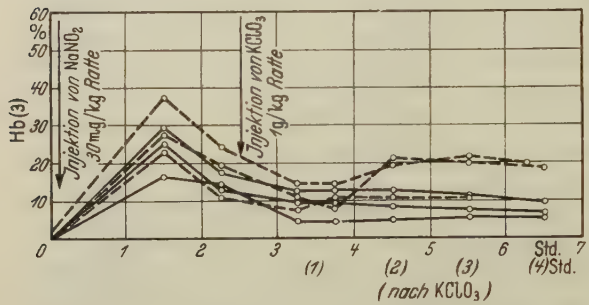


Abb. 8. Wie Abb. 7, nur $2^1/_2$ Stunden Abstand.

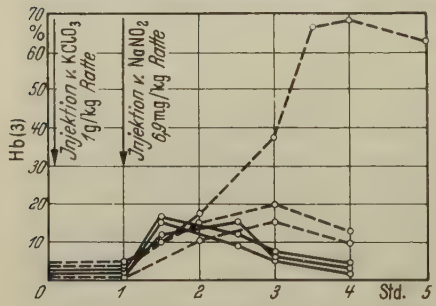


Abb. 9. Drei „alkalische" und 3 „saure" Ratten. Zuerst je 1 g Kaliumchlorat je kg, 1 Stunde später je 30 mg Natriumnitrit je kg. Nach Abklingen der Nitritwirkung einheitlich stärkere Chloratwirkung bei den „sauren" Tieren.

Gegeben wurde je Kilogramm 0,1 Millimol Nitrit. Nach Jung und Remmer[15] werden dadurch maximal 0,2 Millival Hämoglobin in Hämiglobin überführt, also 3,35 g. Auf das Kilogramm Körpergewicht entfallen etwa 7,5 g Blutfarbstoff, wovon bei 70% Umwandlung mehr als 5 g auf Hämiglobin zu rechnen wären. Dazu kommt, daß bei der hohen Reduktionsfähigkeit der Rattenblutkörperchen[16] niemals die stöchiometrisch möglichen Mengen, also über 3 g Hb (3) je Kilogramm im strömenden Blut erwartet werden können. Der nach 6,9 mg (= 0,1 m Mol) Nitrit wirklich erreichte Gipfel von 17% Hämiglobin entspricht für 1 kg Ratte etwa 1,3 g Hämiglobin, kaum mehr als einem Drittel der stöchiometrisch möglichen Menge.

VI.

In einem letzten Versuch wurde geprüft, ob eine ausreichende Säuerung oder Alkalisierung von Ratten gelinge, wenn man sie nicht längere Zeit der entsprechenden Kost aussetzt, sondern *akut* Säure oder Alkali zuführt. Dies geschah durch subkutane Injektion von 0,5 cm³ der 20%igen Salmiaklösung oder 1 cm³ der 5%igen Natriumbikarbonatlösung auf 100 g Tiergewicht subkutan 1 Stunde vor der üblichen Gabe von Kaliumchlorat und 2 Stunden vor derselben *geringen* Nitritgabe wie in der vorgenannten Versuchsreihe. Die Ergebnisse gibt die Abb. 10 wieder. Offensichtlich war — wie zu erwarten — der Effekt der Säuerung und Alkalisierung geringer als in allen früheren Versuchen, dennoch aber erkennbar: Alle 3 „sauren" Tiere hatten $1^1/_2$ Stunden nach der Nitritgabe mit 13% einen deutlich höheren Gehalt an Hämiglobin im Blute als alle 3 „alkalischen" mit 3% des Blutfarbstoffs im Mittel. Und auch hier stieg bei einem der „sauren" Tiere der Gehalt an Hämiglobin $2^1/_2$ Stunden nach der Nitritgabe auf 54% des Blutfarbstoffs an, also offensichtlich durch Chloratwirkung; interessanterweise war es dasjenige Tier, das von Anfang an mit Abstand den höchsten Hämiglobinwert aufgewiesen hatte.

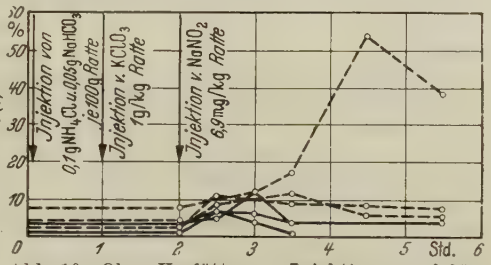


Abb. 10. Ohne Vorfütterung Injektion von 0,05 g $NaHCO_3$ (———) oder 0,1 g NH_4Cl (— — — —) an je 3 Ratten. 1 Stunde später Chlorat, 2 Stunden später Nitrit.

VII.

Die geschilderten Versuche haben erwiesen, daß an Tieren mit einem Überschuß saurer Valenzen im Organismus nach Nitrit- oder Chloratgaben mehr Hämiglobin auftritt als bei einem Überschuß basischer Valenzen. Die Ursache dieser Erscheinung könnte in verschiedenen Momenten gesucht werden. Auszuschließen scheint uns der Gedanke, daß etwa eine Vermehrung der Wasserstoffionen im Blutplasma oder überhaupt der Gewebs*flüssigkeit* an dem Effekt beteiligt sein könnte; denn es ist zu eindeutig ermittelt worden, daß die zur Bildung von Hämiglobin führenden Umsetzungen dieser beiden Salze der Gegenwart des Blutfarbstoffs selbst bedürfen (Chlorat sogar eindeutig der Hb (3)-Stufe). Zum Überfluß hat Viezens[3] noch ausdrücklich festgestellt, daß im Blutserum das Chlorat lange Zeit unverändert bleibt. Man hat also die Wirkung der Säuerung *innerhalb* der roten

Blutzellen zu suchen. Damit ist *erwiesen*, was bisher im wesentlichen Vermutung war, daß nämlich bei oraler Säure- oder Alkalizufuhr sich *innerhalb funktionstüchtiger Zellen* die Zahl der Wasserstoffionen erheblich verschiebt, jedenfalls soweit, daß chemische Umsetzungen deutlich beeinflußt werden. Was hier zunächst für Erythrozyten bewiesen wurde, kann grundsätzlich auch für andere Zellarten in den Geweben angenommen werden.

Welche Umsetzungen es in den beschriebenen Fällen gewesen sind, deren Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl die entscheidende Rolle gespielt hat, mag gegenüber der obigen grundsätzlichen Feststellung zunächst sekundäres Interesse bieten. In Frage kommen natürlich das Redoxpotential Hämiglobin-Hämoglobin (vgl. dazu Haveman n[17]) sowie die das Hb (3) reduzierende Fermentsystem (vgl. dazu Kiese[18]).

Wichtiger aber dürften die Umsetzungen der angewandten Gifte selbst sein. Für das Nitrit beruht die höhere Ausbeute an Hb (3) bei höherer Wasserstoffzahl — wie bereits erwähnt — wohl in erster Linie auf der höheren Konzentration der eigentlich reagierenden Substanz, nämlich der freien schwachen Säure HNO_2. Beim Chlorat wird das eigentlich wirksame Agens, nämlich die freie schwache Säure HClO offenbar erst aus dem Ion der starken Chlorsäure gebildet. Wir vermuten, daß dieser Reduktionsvorgang von der Wasserstoffzahl abhängig ist, etwa entsprechend der Formel

$$ClO_3' + Cl' + 2(H^+) = HClO_2 + HClO.$$

Zusammenfassung.

1. Die hohe Bedeutung der Konzentration an Wasserstoffionen für die Reaktion des Chlorats mit dem Blutfarbstoff wurde an Blutkörperchensuspensionen in vitro bestätigt.

2. Aus technischen Gründen wurde die Kombination von Chlorat und Nitrit an Ratten studiert. Die erhaltenen Ergebnisse lassen die Deutung zu, daß die beiden Salze innerhalb der Blutzellen miteinander in Reaktion treten können.

3. Durch Fütterung mit Salmiak oder Bikarbonat wurden Ratten „gesäuert" oder „alkalisiert". Auch an solchen Tieren — also in vivo — erwies sich die Bildung von Hämiglobin (Hb (3) als erheblich begünstigt durch die Säuerung. Dies galt für das Chlorat, aber ebenso auch für Nitrit.

4. Da die Hämiglobinbildung durch diese Salze rein intrazellulär erfolgt, wurde aus den Ergebnissen geschlossen, daß durch äußere Zufuhr saurer oder basischer Äquivalente die Konzentration an Wasserstoffionen so weit verschoben werden kann, daß die in der Zelle ablaufenden chemischen Umsetzungen deutlich beeinflußt werden.

Literatur.

[1] Nickel, A.: Studien über die Blutwirkung der Chlorate. Diss. Göttingen 1920. [2] Jung, F.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **54**, 454 (1948). — [3] Viezens, A.: Unver-

öffentlichte Untersuchungen im pharmakolog. Inst. Berlin 1948. — [4] Heubner, W., u. F. Jung: Schweiz. med. Wschr. **1941**, Nr 2. — Ber. dtsch. chem. Ges. **1942**, 1636. — [5] Meier, Rolf: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **110**, 241 (1925). — [6] Meier, Rolf: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **100**, 128 (1923). — [7] Mering, I. v.: Das chlorsaure Kali, S. 91. **1885**. — [8] Patzschke: Z. physiol. Chem. **109**, (1920). — [9] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939). — [10] Evelyn, K. A., and H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [11] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [12] Drabkin, D. L., and I. H. Austin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 67 (1935/36). — [13] Masoin: Arch. internat. Pharmacodynam. **5**, 307 (1899). — [14] Becker, Dordoni u. Jung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 197 (1943). — [15] Jung u. Remmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 459 (1949). — [16] Gelinsky, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **195**, 460 (1940). — [17] Havemann, R.: Biochem. Z. **316**, 138 (1943). [18] Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944).

Prof. Wolfgang Heubner, Berlin-Dahlem, Garystr. 9.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 334—351 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Die Nervenbahn als Trägerin der DDT-Vergiftung*.

Von

Alfred Eckart.

(Eingegangen am 10. Januar 1949.)

I.

Grundsätzlich besteht in der Literatur Übereinstimmung, daß der Giftstoff DDT (Dichlordiphenyltrichlormethylmethan) infolge seiner Lipoidlöslichkeit durch die in der Epikutikula enthaltenen Lipoide gelöst wird, in gelöstem Zustande diese und die übrigen Insektenhüllen durchdringt und schließlich bis an die Nervenendigungen oder freien nervösen Organe (Tastkörper der Insekten) vordringt. Dagegen gehen die Ansichten hinsichtlich des Transports und letzten Angriffspunktes im Organismus auseinander. Während die meisten Autoren (P. Läuger, H. Martin und P. Müller[19], 1944; Riemenschneider[2, 14], 1947; Mühlens[6], 1946) nach der Aufnahme des DDT in den Organismus eine Diffusion in die Nervenbahnen oder endoneuralen Lymphbahnen, eventuell mit Transport bis zum Bauchmark als eigentlichem Wirkungsort annehmen, stellt demgegenüber Domenjoz[1] auf Grund von Untersuchungen von Tonner eine Wirkung auf periphere nervöse Zentren als möglich hin und glaubt, auf die Annahme komplizierterer Diffusionsvorgänge in oder längs der Nervenbahnen verzichten zu können. Tonner fand nämlich bei Versuchen an Flußkrebsscheren unmittelbar unter der Epikutikula ein weitgehend differenziertes, peripheres Nervensystem in Form eines subepidermalen Maschenwerkes von multipolaren Ganglienzellen, das Kommunikationen mit dem Fasernetz des zerebromedullären Nervensystems besitzt und außerdem Nervenzweige direkt an Muskeln und Muskelfasern entsendet.

Irmgard Hoffmann und Lendle[17] prüften am Ischiadicus des *Frosches*, ob eine (zentripetale) Wanderung des Giftes nachweisbar sei, kamen aber nach ihren Befunden zu der Schlußfolgerung, „daß das Gift nicht durch Nervenwanderung zum Zentralnervensystem gelangt".

Welche von beiden Auffassungen (für Insekten) den Vorzug verdient, versuchte ich an Hand einer Versuchsreihe zu klären.

Eigene Versuche.

Als Versuchsobjekte wurden Stabheuschrecken (Carausius morosus oder Dixippus) verwendet. Ihre Wahl beruhte auf zwei Gründen: erstens sind sie als besonders giftfest bekannt (Riemenschneider[14],

* Etwas veränderte Fassung der med. Diss. des Verf. mit gleichem Titel, Berlin 1948.

1947), also sehr resistent gegen chemische Insektizide, und zweitens sind sie infolge ihrer Größe besonders für Versuche mit verschieden lokalisierten Angriffspunkten geeignet.

Anatomisch gliedern sie sich in Kopf, Prothorax, Mesothorax, Metathorax, Abdomen mit 10 Gliedern. Die einzelnen Körperabschnitte sind durch Gelenkhäute miteinander verbunden. Vom Thorax gehen, entsprechend den 3 Abschnitten, 3 Beinpaare ab. Das Nervensystem ist strickleiterförmig angeordnet und geht vom Gehirn über das Unterschlundganglion zu den durch Konvektive verbundenen drei thorakalen und den abdominalen Ganglien (Bordas[11], 1907), von denen feine Verbindungen zum Darm, den Ovarien, den Extremitäten und den Gelenkhäuten ausgehen. Nerven und Ganglienknoten haben ein glasiges, gallertiges Aussehen und liegen auf der ventralen Seite des Verdauungstraktes. Physiologisch neigen die Tiere von Natur aus zu katatonischen Stellungen. Sie zeigen — besonders vor dem Tode — öfters Autotomierung von Gliedmaßen. Über den Gangrhythmus vgl. von Buddenbrock[12], 1921. — Operative Eingriffe sind wegen des stark entwickelten, silberhellglänzenden Tracheensystems sehr schwierig (Marshall und Severin[13], 1906).

Für die Versuche wurden insgesamt 234 Tiere verwendet.

II. Ausbreitung der Wirkung von verschiedenen Applikationsstellen aus.

Technik. Für die ersten Versuchsreihen, die der Frage dienten, ob die Giftwirkung an bestimmte Zentren oder Abschnitte des Nervensystems gebunden ist, wurde eine 35%ige Lösung von reinem Dichlordiphenyltrichloräthan (von der Firma Schering) in Benzol hergestellt und auf eine Fließpapierfläche von 100 cm^2 1,5 cm^3 dieser Lösung mittels Pipette gleichmäßig verteilt, so daß auf 1 mm^2 0,00015 cm^3 Lösung, d. h. 0,0525 mg DDT kamen. Das vorbereitete Fließpapier wurde dann luftgetrocknet und hiervon jeweils 1 mm^2 dem einzelnen Versuchstier auf operativem Wege einverleibt.

Um an das Unterschlundganglion zu gelangen, wurde am kranialen Ende des ungepanzerten Halses, dort, wo der Kopfpanzer mit den Mundwerkzeugen beginnt, ein 1 mm langer Hautschnitt gelegt und durch diesen 1 mm^2 mit DDT beschicktes Fließpapier mittels Pinzette an das Ganglion herangeschoben. Die Wunde verklebte in wenigen Sekunden bis 2 Min. Für das Vorderbeinganglion (Prothorax) wurde der Schnitt 1 mm kranialwärts von den Vorderbeinen in den Anfangsteil des ungepanzerten Halses gelegt, dort, wo der Körperpanzer aufhört. Die Schnitte für das Mittelbeinganglion (Mesothorax) und Hinterbeinganglion (Metathorax) wurden jeweils 1 mm kranial von den Mittel- bzw. Hinterbeinen, für das 2. Abdominalganglion 1 mm kaudalwärts vom 2. Abdominalgelenk im 2. Abdominalsegment ausgeführt. Im übrigen wurde wie oben verfahren. Schließlich wurde in je einer Versuchsreihe vorweg geprüft, ob die Einbringung eines nur mit Benzol getränkten, luftgetrockneten Fließpapiers — als Kontrollversuch (31A) — bereits Wirkungen toxischer Art hervorrief, sowie,

ob bei Einbringung der Substanz in die Körperflüssigkeit und bei Einbringung in die Muskulatur ohne Beziehung zu den Ganglien DDT-Wirkungen auftreten. Zu diesem Zwecke wurde auf dem Rücken der Tiere am Mesothorax ein 1 mm langer kraniokaudaler Schnitt gelegt und der Wirkstoff wie oben eingebracht. Für den Muskelversuch wurde für den Schnitt der Oberschenkel des Vorder-, Mittel- oder Hinterbeines gewählt und der Wirkstoff wie oben einverleibt. Während der Versuchszeit erhielten die Tiere als Nahrung Blätter (Linde, Tradescantia, Epheu) und Wasser in Form von feuchtem Fließpapier. Die Temperatur betrug 25—28° C. Die Beobachtungsdauer ging für jede Versuchsreihe über 96 Stunden.

Versuchsreihe I: Einbringung in die Körperflüssigkeit. Tiere Nr. 251—255E. Während des 96stündigen Versuches traten bei keinem Tiere Erscheinungen auf, die auf eine DDT-Vergiftung hindeuteten. Alle Tiere verhielten sich auch über die Versuchszeit hinaus normal.

Versuchsreihe II: Applikation an der Muskulatur. Vorderbein: Tiere Nr. 127, 128, 163, 164H; Mittelbein: Tiere Nr. 123, 124, 159, 160H; Hinterbein: Tiere Nr. 125, 126, 161, 162H.

Die einzige auf diesen Angriff zu beobachtende Reaktion bestand darin, daß 8 der 12 Versuchstiere das jeweils betroffene Bein beim Laufen nicht mitbewegten und es nach einer gewissen Zeit, die zwischen 7 und 28 Stunden schwankte, abwarfen. Bei 3 von den restlichen 4 Tieren war das Bein nur beim Laufakt ausgeschaltet und bei dem 4. war überhaupt keine Wirkung zu beobachten. Im übrigen zeigten alle Tiere sonst normales Verhalten.

Das Abwerfen des Beines ist indes nicht auf DDT-Wirkung zurückzuführen, sondern dürfte nur als Reaktion auf den Fremdkörperreiz anzusehen sein.

Versuchsreihe III: Applikation am Unterschlundganglion. Tiere Nr. 67A, 68A, 69B, 70B, 71C, 72C (Tabelle 1).

Tier Nr. 67A: Nach 4 Stunden traten lokale Erscheinungen in Form von Mundwerkzeugtremor auf. Aufsteigende Wirkung (Kopftremor) war nach 7 Stunden zu erkennen. Nach 14 Stunden wurde das Tier apathisch und lief unsicher. Nach 19 Stunden trat grüner Saft aus der Mundöffnung (Erbrechen oder Abwehrreaktion?). Absteigende Wirkung (Körperzuckungen) zeigte sich nach 22 Stunden deutlich. Nach heftigem Tremor des Kopfes und der Mundwerkzeuge wurde das Tier nach 39 Stunden ruhiger und wies erst nach 50 Stunden wieder stärkere Erscheinungen auf. Hinterbeinzuckungen waren nach 63 Stunden erkennbar. Lähmung der Vorderbeine war nach 72 Stunden festzustellen.

Tier Nr. 68A: Nach 4 Stunden Auftreten von Mundwerkzeugtremor (lokale Wirkung), dem nach 5 Stunden aufsteigende Wirkung in Form von Fühlerzuckungen folgte. Das Tier wurde zunehmend erregter. Nach 14 Stunden kamen Körperzuckungen hinzu (absteigende Wirkung). Dieser Zustand steigerte sich und nahm erst nach 29 Stunden an Heftigkeit wieder ab, um nach 46 Stunden noch einmal aufzuflackern. Mittelbeintremor zeigte sich nach 49 Stunden und Hinterbeintremor nach 63 Stunden. Die Erscheinungen ließen erst nach 77 Stunden nach.

Tier 69B: Nach 3 Stunden traten lokale auf- und absteigende Wirkungen auf (Mundwerkzeugtremor, Kopf- und Fühlertremor und Vorderbeintremor). Steigende Unruhe, nach 7 Stunden Schaum vor dem Munde; Zuckungen des ganzen Körpers nach 19 Stunden. Vorübergehende Rückenlage nach 24 Stunden.

Die Erscheinigungen schwächten sich nur wenig ab und bestanden konstant bis 77 Stunden.

Tier Nr. 70B: Die ersten Lokalwirkungen traten nach voraufgehender Unruhe nach 3 Stunden auf; ihnen folgte nach 4 Stunden aufsteigende Wirkung in Form von Kopftremor. Nach 5 Stunden waren auch absteigende Wirkungen zu erkennen (Vorderbeinzuckungen). Allmähliche Steigerung der Erscheinungen; nach 7 Stunden Schaum vor dem Munde, bis zur 19. Stunde anhaltend. Gegen Ende des Versuches traten Mittel- und Hinterbeintremor hinzu und nach 73 Stunden leichte Lähmung der Vorderbeine.

Tier Nr. 71C: Nach 1 Stunde vorübergehend absteigende Wirkungen in Form von Körper- und Vorderbeinzuckungen. Erst nach 3 Stunden traten sie wieder auf. Lokalerscheinungen (Mundwerkzeugtremor) bestanden nach 4 Stunden, aufsteigende (Fühlerzuckungen) nach 5 Stunden. Zunehmende Intensität bis zur 14. Stunde, danach Auftreten von Körperzuckungen. Nach 19 Stunden hatte das Tier grünen Saft am Mund; zunehmende Erregtheit. Gegen Ende des Versuches Auftreten von Mittel- und Hinterbeinzuckungen.

Tier Nr. 72C: Absteigende Wirkungen traten nach 3 Stunden auf (Vorderbeinzuckungen). Nach 4 Stunden kamen Körperzuckungen hinzu. Lokalerscheinungen entwickelten sich nach 6 Stunden (Mundwerkzeugtremor), aufsteigende nach 7 Stunden (Fühlerzuckungen). Mäßige Steigerung bis zur 30. Stunde, alsdann allmähliche Abnahme bis zum Ende des Versuches.

Tabelle 1. *Versuchsreihe III: Applikation am Unterschlundganglion.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
67 A	4	4	7	22	73	—
68 A	4	4	5	14	—	—
69 B	3	3	3	3	—	—
70 B	3	3	4	5	73	—
71 C	1	4	5	1	—	—
72 C	3	6	7	3	—	—

Versuchsreihe IV: Applikation am Hinterbeinganglion. Tiere Nr. 39C, 40D, 44B, 48E, 49E, 53B, 58E, 59E, 60E, 78—82E (Tabelle 2).

Tier Nr. 39C: Nach 5 Stunden trat lokale Wirkung (Hinterbeintremor rechts) auf; das Bein wurde beim Laufen nicht mitbewegt. Nach 15 Stunden zuckten beide Hinterbeine, außerdem stellte sich aufsteigende Wirkung (Körperzuckungen) ein. Beide Hinterbeine waren nach 20 Stunden gelähmt, zum Laufen wurden nur die Mittel- und Vorderbeine benutzt. Mittelbeintremor trat erst nach 21 Stunden hinzu (aufsteigende Wirkung). Nach 24 Stunden zeigte sich auch Lähmung des linken Vorderbeines. Absteigende Wirkung setzte nach 29 Stunden ein (Schwanzzuckungen). Das Tier wurde nach 56 Stunden ruhiger und zeigte bisweilen Rückenlage. Der Zustand hielt bis zum Versuchsende an.

Tier Nr. 40D: Nach 5 Stunden zeigten sich lokale Wirkungen (Hinterbeinzuckungen), nach 7 Stunden trat Unsicherheit im Laufen ein. Exitus letalis nach 15 Stunden.

Tier Nr. 44B: Als erste Wirkungen traten nach 2 Stunden Schwanz- und Körperzuckungen (auf- und absteigende Wirkungen) auf. Nach 3 Stunden setzte starke Erregung ein, nach 5 Stunden zeigten sich auch Fühlerzuckungen. Hinterbeinlähmung und Unsicherheit beim Laufen entwickelten sich nach 10 Stunden;

zeitweilige Rückenlage. Nach 19 Stunden trat Bewegungsunfähigkeit ein, die bis zum Versuchsende anhielt; daneben bestanden wechselnd Mundwerkzeug- und Fühlertremor und Schwanz- und Hinterbeintremor.

Tier Nr. 48E: Das Tier zeigte bis zur 14. Stunde das gleiche Verhalten wie Tier 44B. Zu dieser Zeit wurde das linke Hinterbein abgeworfen. Bis zur 38. Stunde bestand ständig Rückenlage bei Fortdauer der bis dahin beobachteten Zuckungen. Die Erscheinungen ließen dann nach. Bis zum Ende des Versuches blieb das Tier matt und zeigte mäßige Mittel- und Vorderbeinzuckungen. In der 96. Stunde wurde das rechte Hinterbein abgeworfen.

Tier Nr. 49E: Die Erscheinungen begannen nach 2 Stunden mit absteigender Wirkung (Schwanzzuckungen), aufsteigende (Körperzuckungen) setzten erst nach 3 Stunden ein. Bis zur 14. Stunde Verhalten wie 44B und 48E. Nach 19 Stunden vorübergehend Rückenlage; das Tier war nach 28 Stunden wieder lebhafter, kletterte an die Decke des Gefäßes und blieb hier für den Rest der Versuchszeit bei gleichzeitigen Zuckungen der Mittelbeine und Hinterbeine.

Tier Nr. 53B: Nach 4 Stunden setzte schwache absteigende Wirkung (Schwanzzuckungen) ein; Lähmung beider Hinterbeine trat nach 15 Stunden auf; nach 24 Stunden wurden außerdem Zuckungen derselben beobachtet. Dieser Zustand hielt bis zur 56. Stunde an; dann kamen Mittel- und Vorderbeinzuckungen hinzu.

Tier Nr. 58E: Nach 5 Stunden trat lokale Wirkung (Hinterbeintremor rechts) auf, der nach 7 Stunden Lähmung folgte. Lähmung des linken Hinterbeines nach 15 Stunden, ebenfalls Schwanztremor und Rückenlage; nach 24 Stunden kamen Körperzuckungen hinzu. Nach 32 Stunden Mittelbeintremor und nach 68 Stunden Vorderbeinzuckungen und Mundwerkzeugtremor. In der 2. Hälfte des Versuches hing das Tier vorwiegend an der Decke des Gefäßes.

Tier Nr. 59E: Beginn mit lokalen, auf- und absteigenden Erscheinungen (Hinterbein-, Körper- und Schwanzzuckungen). Nach 5 Stunden zunehmende Erregung und Tremor der Mittelbeine. Das linke Hinterbein war nach 7 Stunden, das rechte nach 15 Stunden gelähmt. Dieser Zustand hielt bis zur 68. Stunde an, wobei Mittelbein- und Hinterbeinzuckungen überwogen. Das Tier kletterte oft an die Decke. In der restlichen Versuchszeit Vorderbeintremor.

Tier Nr. 60E: Das Tier zeigte zunächst nur Lokalwirkungen (Hinterbeinzuckungen), absteigende Wirkungen (Schwanzzuckungen) nach Verlauf von 4 Stunden. Das linke Hinterbein war nach 6 Stunden, das rechte nach 14 Stunden gelähmt. Nach 18 Stunden aufsteigende Erscheinungen in Form von Körperzuckungen. Zwischen 28 und 42 Stunden bestanden Mittelbein- und Vorderbeintremor, ferner Tendenz zur Rückenlage. Die Wirkungen ließen langsam nach, und es bestand abwechselnd Mittel-, Vorder- und Hinterbeintremor bis zum Ende des Versuches.

Tier Nr. 78E: Das Tier wies nach 6 Stunden Schwanzzuckungen auf (absteigende Wirkung), denen nach 7 Stunden Hinterbeintremor und Lähmung des rechten Hinterbeines folgten. Das linke Hinterbein war nach 14 Stunden gelähmt; nach dieser Zeit traten auch aufsteigende Wirkungen auf (Körperzuckungen). Zwischen der 19. und 48. Stunde zeitweilige Rückenlage. Nach 22 Stunden wurde das linke Hinterbein abgeworfen. Mundwerkzeug- und Vorderbeintremor entwickelten sich nach 24 und 29 Stunden. Die Erscheinungen ließen nach 50 Stunden langsam nach.

Tier Nr. 79E: Auf- und absteigende Erscheinungen waren nach 6 Stunden in Form von Körper- und Schwanzzuckungen zu erkennen. Nach 14 Stunden kamen Hinterbeinzuckungen hinzu (lokale Wirkung). Nach vorübergehendem Ansteigen der Erscheinungen nahmen diese nach 29 Stunden langsam ab. Bis zum Schluß zeigte das Tier nur noch geringere lokale und absteigende Wirkungen (Hinterbein- und Schwanzzuckungen).

Tabelle 2. *Versuchsreihe IV: Applikation am Hinterbeinganglion.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
39 C	5	5	15	29	5	—
40 D	5	5	—	—	—	15
44 B	2	10	2	2	10	—
48 E	2	10	2	2	10	—
49 E	$2^1/_2$	10	3	$2^1/_2$	10	—
53 B	4	15	45	4	15	—
58 E	5	5	24	15	7	—
59 E	4^{20}	4^{20}	5	4^{20}	7	—
60 E	3^{20}	3^{20}	14	4	6	—
78 E	6	7	14	6	7	—
79 E	6	14	7	6	—	—
80 E	4	4	4	4	6	—
81 E	4	4	4	4	6	—
82 E	3	3	4	4	6	73

Tiere Nr. 80—82 E: Die Tiere zeigten in ihrem Verhalten große Übereinstimmung mit den vorgehend beschriebenen Tieren, so daß der Ablauf zusammenfassend dargestellt werden kann. Nach 3—4 Stunden traten lokale auf- und absteigende Wirkungen auf (Hinterbein-, Körper- und Schwanzzuckungen). Zunehmende Erregung; nach 6 Stunden bestand bei allen Tieren Lähmung beider Hinterbeine. Nach 18—46 Stunden häufige Rückenlage und bei Tier 80E und 81E aufsteigende Erscheinungen (Vorderbein- und Mittelbeintremor, Fühler- und Mundwerkzeugtremor). Tier 82 E zeigte Mittelbeinzuckungen nach 29 Stunden und Vorderbeintremor nach 46 Stunden. Die Wirkungen ließen nach 49 Stunden stark nach, und bis zum Schluß des Versuches konnten nur noch leichte lokale Wirkungen festgestellt werden (Hinterbeinzuckungen). Das Tier 82E starb nach 73 Stunden.

Versuchsreihen V, VI und VII: Da die Versuchsreihen V, VI und VII (Applikation am Vorderbein-, Mittelbein- und 2. Abdominalganglion) sich in ihrem Verlaufe weitgehend mit den Versuchsreihen III und IV decken, kann davon abgesehen werden, ihren Ablauf im einzelnen zu schildern. Für den Zweck dieser Arbeit genügt es, ihre grundsätzlichen Ergebnisse in Tabellenform wiederzugeben (Tabelle 3, 4 und 5).

Bei der Darstellung in Tabellenform hat es sich als ausreichend erwiesen, die Wirkungen in Lokal- und Allgemeinwirkungen zu unterteilen, wobei unter Lokalwirkungen solche Wirkungen zu verstehen sind, die unmittelbar am Orte der Applikation oder in seiner nächsten Umgebung auftreten, während zu den Allgemeinwirkungen nicht nur solche zu rechnen sind, die am ganzen Körper auftreten (Körperzuckungen), sondern auch solche, die sich vereinzelt an einem entfernt gelegenen anderen Organ zeigen. Denn um hier auftreten zu können, ist ein Transport des Giftstoffes im Körper an diesen Ort erforderlich, was besagt, daß der Giftstoff im Körper über den eigentlichen Ort seiner Einbringung hinaus gewandert sein muß. Unter aufsteigenden

Tabelle 3. *Versuchsreihe V: Applikation am Vorderbeinganglion.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
41 E	44	—	44	44	—	—
42 F	—	—	—	—	—	46
45 C	6	6	6	—	—	—
50 F	10	10	$10^1/_2$	26	—	—
51 F	10	10	10	38	—	—
54 C	45	48	45	45	—	—
61 F	51	—	51	—	—	—
62 F	32	48	32	42	—	—
63 F	18	28	18	28	—	—
83 F	3	3	5	29	6	—
84 F	6	13	6	—	13	—
85 F	4	4	22	13	13	—
86 F	4	4	5	70	13	—
87 F	6	6	6	—	—	—

Tabelle 4. *Versuchsreihe VI: Applikation am Mittelbeinganglion.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
33 C	—	—	—	—	—	89
37 A	15	15	—	—	—	—
38 B	—	—	—	—	—	—
43 A	19	—	19	—	—	—
46 D	24	—	24	—	—	—
47 D	—	—	—	—	—	—
52 A	32	32	32	32	—	—
55 D	19	28	19	42	78	—
56 D	28	48	28	32	—	—
57 D	5	5	19	24	15	—
73 D	14	14	—	—	14	—
74 D	14	—	14	39	—	—
75 D	14	14	14	14	14	—
76 D	14	19	14	39	73	—
77 D	7	14	7	—	14	—

Tabelle 5. *Versuchsreihe VII: Applikation am 2. Abdominalganglion.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
64 G	23	23	49	—	—	—
65 G	3	3	18	—	—	—
66 G	14	14	18	—	28	—
88 G	3	6	3	—	—	—
89 G	6	6	18	—	73	—
90 G	18	18	—	—	—	—
91 G	39	39	39	—	—	—
92 G	13	13	13	—	—	—

Wirkungen sind solche Wirkungen zu verstehen, die von der Applikationsstelle aus gesehen in kranialer Richtung auftreten, während absteigende Wirkungen durch die Richtung kaudalwärts bestimmt werden. Die geringe Zahl der während der Versuchsdauer eingetretenen Todesfälle erklärt sich aus dem oben angegebenen Ziel des Versuches.

III. Ausbreitung der Wirkung bei unterbrochener Nervenleitung.

Technik: Bei diesen Versuchen wurde DDT nicht in Substanz, sondern in Form von 10%iger Vaseline verwendet und der Giftstoff nicht wie vorher in den Körper oder an die Ganglien eingebracht, vielmehr wurde die Salbe wechselnd in den einzelnen Versuchen an die Tarsen der Hinter- und Mittelbeine, an die Thorax-Abdominalgelenkhaut und an die Gelenkhaut des 3. Abdominalgelenkes appliziert. Die Nervenleitung wurde einmal durch Quetschung des zugehörigen bzw. benachbarten Ganglions (Hinterbeinganglion) und zum anderen durch Durchtrennung der Nervenleitung oberhalb dieses Ganglions unterbrochen.

Die Operationen zur Durchtrennung der Nerven wurden unter dem Binokularmikroskop durchgeführt:

In Höhe der für die vorherigen Versuche angelegten Schnitte, d. h. 1 mm kranial von den Hinterbeinen, wurde ein Schnitt gelegt, der den gesamten Bauchpanzer des Metathorax quer durchtrennte, dann wurde die Operationswunde durch einen kaudalwärts geführten, etwa 1 mm langen Schnitt senkrecht zu dem ersten erweitert. Die Operationswunde hatte also ein T-förmiges Aussehen; an den entstandenen Ecken wurden die Wundränder aufgeklappt und das Ganglion freigelegt. Der Eingriff als solcher ist sehr groß, und im allgemeinen verloren die Tiere viel Flüssigkeit. Die Wunde verklebte nach $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde und brach bei keinem Tier während oder nach dem Versuch auf.

Für die Versuche wurden 90 Stabheuschrecken in 5 Hauptgruppen eingeteilt; nachdem zunächst in Kontrollversuchen die Wirkung des rein operativen Eingriffs: a) Quetschung des Hinterbeinganglions (3 Tiere), b) Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions (3 Tiere), c) Anbringung reiner Vaseline (22 A) und schließlich noch (in Versuchsreihe XII) Einbringung von 10%iger DDT-Vaseline in die Körperflüssigkeit auf dem dorsalen Mesothorax (5 Tiere), geprüft worden war, wurde 10%ige DDT-Vaseline bei den einzelnen Versuchsreihen in nachstehender Weise angebracht:

Versuchsreihe VIII: an die Hinterbeintarse (6 Tiere), dasselbe bei Quetschung des Hinterbeinganglions (6 Tiere), sowie bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions (14 Tiere);

Versuchsreihe IX: an die Mittelbeintarse (7 Tiere), dasselbe bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions (7 Tiere);

Versuchsreihe X: ventral an die Metathorax-Abdominalgelenkhaut (7 Tiere), dasselbe bei Quetschung des Hinterbeinganglions (6 Tiere), sowie bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions (6 Tiere);

Versuchsreihe XI: ventral an die 3. Abdominalgelenkhaut (7 Tiere), dasselbe bei Quetschung des Hinterbeinganglions (6 Tiere), sowie bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions (6 Tiere).

Tabelle 6. *Versuchsreihe VIII, 1: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Hinterbeintarse.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Minuten	Lokalsymptome nach Minuten	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
168 C	20	20	17	38	10	—
169 C	20	20	1	10	—	—
170 C	20	20	2	2	—	—
171 C	20	20	15	45	—	—
172 C	20	20	20 Min.	24	10	—
173 C	20	20	20 ,,	15	15	—

Versuchsreihe VIII, 1: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Hinterbeintarse; Tiere Nr. 168—173C an die linke, Tier Nr. 169C an die rechte (Tabelle 6).

Bereits nach 20 Min. traten bei allen Tieren Lokalerscheinungen in Form von Tremor des behandelten Hinterbeines auf. Nach 40 Min. machte sich bei allen stärkere Erregbarkeit bemerkbar. Aufsteigende Wirkungen in Form von Körperzuckungen zeigten sich schon nach 20 Min. (172C und 173C) bis 3 Stunden (169C und 170C).

Das Tier 172C entwickelte nach 2 Stunden absteigende Wirkungen (Schwanzzuckungen). Lähmung des linken Hinterbeines trat bei 3 Tieren (168C, 170C und 172) nach 10 Stunden, bei 171C und 173C nach 15 Stunden auf. Die Tiere 169C und 173C zeigten auch Schwanzzuckungen. Nach 17 Stunden waren bei 168C, 170C und 173C aufsteigende Wirkungen (Vorderbeintremor) zu erkennen. Bei allen Tieren traten nach vorübergehendem Beruhigungszustand nach 45 Stunden heftigere Erscheinungen in Form von Körper-, Vorderbein- und Schwanzzuckungen auf. Nach 68 Stunden wurden die Tiere 170C und 173C bis an das Versuchsende bewegungsunfähig. Die anderen Tiere ließen langsames Nachlassen der Wirkungen erkennen. Das Tier 173C warf nach 92 Stunden das linke Mittelbein ab.

Versuchsreihe VIII, 3: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die linke Hinterbeintarse bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb

Tabelle 7. *Versuchsreihe VIII, 2: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die linke Hinterbeintarse bei Quetschung des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
174 D	22	33	22	—	—	—
175 D	13	—	13	—	—	93
176 D	22	27	22	—	—	—
177 D	4	22	4	22	—	—
178 D	6	—	6	22	—	—
179 D	22	33	22	—	—	69

Tabelle 8. *Versuchsreihe VIII, 3: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die linke Hinterbeintarse bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
219 D	14	43	—	14	—	92
220 D	12	—	—	12	—	43
221 D	12	—	—	12	—	40
222 D	2	21	—	2	—	57
223 D	2	—	—	2	—	57
224 D	2	35	—	2	—	57
236 C	11	25	—	11	—	68
237 C	7	46	—	7	—	—
238 C	11	40	—	11	—	—
239 C	19	19	—	23	—	68
240 C	13	25	—	13	—	—
241 C	11	40	—	11	—	—
250 C	16	16	—	22	—	64

des Hinterbeinganglions. Tiere Nr. 219—224D, 236—241C, 250C (Tabelle 8). Schwanzzuckungen waren bei den Tieren 222—224D nach 2 Stunden, bei 220D und 221D nach 12 Stunden und bei 219D nach 14 Stunden zu beobachten (absteigende Wirkung).

Die Tiere 220D und 221D wurden völlig bewegungsunfähig. Tier 221D warf nach der 35. Stunde beide Mittel- und Vorderbeine ab und starb nach 40 Stunden, während 220D nach Abwurf des linken Vorderbeines nach 45 Stunden zum Exitus kam.

Auch die übrigen Tiere wurden sämtlich bewegungsunfähig und starben nach 57 Stunden bzw. 92 Stunden.

Tiere Nr. 236—241C: Hervorzuheben ist, daß Giftwirkungen in dieser Versuchsreihe erst nach wesentlich längerer Latenzzeit (7 Stunden) auftraten und daß alle Tiere trotz des operativen Eingriffes zunächst ihr normales Verhalten beibehielten. Mit Sichtbarwerden der Giftwirkungen verlief dieser Versuch in der gleichen Art wie bei den Tieren Nr. 219—224D, nur daß hierbei gewisse zeitliche Verschiebungen eintraten und nur 2 Tiere (236C und 239C) nach 68 Stunden zum Exitus kamen.

Tier Nr. 250C: Das Tier 250C zeigte nach 16 Stunden Hinterbeinzuckungen links (lokale Wirkung); Schwanzzuckungen (absteigende Wirkung) traten nach 22 Stunden auf. Das Tier wurde nach 30 Stunden bewegungsunfähig und starb nach 64 Stunden.

Bei allen Tieren erstreckten sich die erregenden Giftwirkungen auf die Hinterbeine und den Schwanz und gingen nicht über die Durchtrennungsstelle kranialwärts hinaus, d. h. nicht auf die Mittel- und Vorderbeine und das Unterschlundganglion (vgl. Tabelle 8).

Versuchsreihe IX, 1: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Mittelbeintarse, Tiere Nr. 204—209I an die linke, Tier Nr. 23B an die rechte (Tabelle 9).

Tabelle 9. *Versuchsreihe IX*, 1: *Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Mittelbeintarse.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
23 B	40 Min.	40 Min.	5	6	—	97
204 I	3	3	8	8	3	—
205 I	3	3	3	8	3	—
206 I	3	3	3	46	—	—
207 I	3	3	26	—	—	93
208 I	3	3	12	5	3	—
209 I	12	—	12	26	—	—

Das Tier 23B zeigte bereits nach 40 Min. Tremor des rechten Mittelbeines, während bei den Tieren 204—209I der Tremor erst nach 3 Stunden am linkee Mittelbein auftrat. Nach 5 Stunden wies 23B Vorderbeinzuckungen (aufsteigendn Wirkung), nach 6 Stunden auch Mittel- und Hinterbeinzuckungen und Körperzuckungen auf (absteigende Wirkung). Es wurde nach 78 Stunden bewegungsunfähig und starb nach 97 Stunden. Bei den Tieren 204—209I entwickelten sich nach 3—8 Stunden Allgemeinwirkungen in Form von Körper- und Hinterbeinzuckungen. Lähmungen traten bei 3 Tieren (204I, 205I und 208I) nach 3 Stunden an den Hinterbeinen auf. Nach 54 Stunden bestanden Vorderbeinzuckungen bei 3 Tieren (204I, 205I und 209I) und Hinterbein- und Körperzuckungen bei allen Tieren. Die Tiere 207I und 208I wurden nach 80 Stunden, Tier 209I nach 93 Stunden bewegungsunfähig. Das Tier 207I starb nach 93 Stunden, das Tier 208I warf zur gleichen Zeit die Mittelbeine ab.

Versuchsreihe IX, 2: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die linke Mittelbeintarse bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions. Tiere Nr. 242—247D und Tier Nr. 249B (Tabelle 10).

Nach 3—7 Stunden zeigten alle Tiere Zuckungen des linken Mittelbeines (lokale Wirkung), und nach 11 Stunden traten die ersten Lähmungen des linken

Tabelle 10. *Versuchsreihe IX*, 2: *Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die linke Mittelbeintarse bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
242 D	7	7	16	—	—	—
243 D	3	3	19	—	—	97
244 D	7	7	16	—	—	—
245 D	7	7	11	—	11	—
246 D	7	7	21	—	11	—
247 D	7	7	11	—	43	—
249 B	16	16	22	—	—	64

Tabelle 11. *Versuchsreihe X*, 1: *Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Metathorax-Abdominalgelenkhaut.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
28 E	5	63	36	63	—	—
180 E	13	13	22	22	—	—
181 E	9	22	9	22	33	—
182 E	22	22	22	22	—	—
183 E	22	22	22	22	—	93
184 E	13	22	13	22	—	—
185 E	22	22	22	22	33	—

Mittelbeines bei den Tieren Nr. 245D und 246D auf. Die Tiere 245D und 247D entwickelten außerdem aufsteigende Erscheinungen (Vorderbein- und Mundwerkzeugtremor). Das gleiche trat bei den Tieren Nr. 242D, 244D und 249B nach 16 Stunden ein. Nach 21 bzw. 22 Stunden waren bei allen Tieren die aufsteigenden Wirkungen besonders stark entwickelt, nachdem sich schon nach 16 bzw. 19 Stunden Zuckungen des vorderen Teiles des Körpers bei den Tieren 243D und 245D gezeigt hatten. Bei den Tieren 242D, 244D und 245D konnte nach 34 Stunden beginnende Neigung zur Rückenlage beobachtet werden. Oberkörperzuckungen bestanden bei 274D nach 34 Stunden und bei 246D nach 40 Stunden. Das Tier 249B wurde nach 46 Stunden bewegungsunfähig, mit tödlichem Ausgang nach 64 Stunden. Bis zum Versuchsende waren bei den übrigen Tieren wechselnde aufsteigende Wirkungen und bei 243D allmählich zunehmende Bewegungsunfähigkeit festzustellen. Das Tier 243D starb nach 97 Stunden.

Alle beobachteten Erscheinungen spielten sich an den Mittelbeinen und kranialwärts von diesen, d. h. in aufsteigender Richtung ab. Wirkungen kaudalwärts von der Durchtrennungsstelle konnten nicht beobachtet werden.

Versuchsreihe X, 1: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Metathoraxabdominalgelenkhaut. Tiere Nr. 180—185E ventral, Tier Nr. 28E dorsal (Tabelle 11).

Nachdem einzelne Tiere schon nach 5 bzw. 9 bzw. 13 Stunden Wirkungen gezeigt hatten, waren nach 22 Stunden bei allen Tieren Körper-, Schwanz- und

Tabelle 12. *Versuchsreihe X*, 2: *Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Metathorax-Abdominalgelenkhaut (ventral) bei Quetschung des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
186 F	33	—	33	—	—	—
187 F	33	33	33	33	33	—
188 F	27	54	27	54	—	69
189 F	22	—	22	—	—	—
190 F	4	4	33	4	—	85
191 F	22	—	22	—	—	93

Tabelle 13. *Versuchsreihe X, 3: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Metathorax-Abdominalgelenkhaut (ventral) bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
213 C	12	12	—	12	—	48
213 C	12	12	—	12	—	43
215 C	12	12	—	12	—	48
216 C	12	12	—	12	—	48
217 C	12	12	—	12	—	43
218 C	12	12	—	12	—	48

Hinterbeinzuckungen festzustellen (aufsteigende und lokale Wirkungen), die im Laufe der Versuchsdauer wechselten. In der zweiten Hälfte der Versuchszeit traten, auch gleichfalls wechselnd, Mittelbein-, Vorderbein-, Kopf- und Mundwerkzeugtremor auf. Die Tiere 183E und 184E wurden bewegungsunfähig, Tier 183E kam nach 93 Stunden ad exitum.

Versuchsreihe X, 3: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Metathorax-Abdominalgelenkhaut (ventral) bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions. Tiere Nr. 213—218C (Tabelle 13).

Die ersten Symptome traten nach 12 Stunden in Form von Schwanzzuckungen (absteigende Wirkung) auf, die auch für die weitere Versuchszeit festgestellt wurden. Alle Tiere wurden bewegungsunfähig und starben 43 bzw. 46 Stunden. Zuckungen der Vorderbeine, Mittelbeine, des Kopfes und der Mundwerkzeuge oder des Oberkörpers wurden nicht festgestellt.

Versuchsreihe XI u. a.: Außer den Versuchsreihen VIII, IX und X wurden noch Versuche mit Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die 3. Abdominalgelenkhaut ohne (Versuchsreihe XI, 1) und mit Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions

Tabelle 14. *Versuchsreihe XI, 1: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die 3. Abdominalgelenkhaut.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
29 F	5	5	5	—	54	—
192 G	21	21	21	—	—	93
193 G	8	78	8	—	—	93
194 G	8	8	8	—	—	93
195 G	21	33	21	—	—	93
196 G	21	80	21	—	—	93
197 G	21	—	21	—	—	93

Tabelle 15. *Versuchsreihe XI, 2: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die 3. Abdominalgelenkhaut (ventral) bei Quetschung des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
198 H	12	12	21	—	—	—
199 H	8	8	37	—	—	93
200 H	8	8	26	—	—	—
201 H	12	12	33	—	—	54
202 H	21	21	46	—	—	—
203 H	8	8	33	—	93	—

Tabelle 16. *Versuchsreihe XI, 3: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die 3. Abdominalgelenkhaut (ventral) bei Durchtrennung der Nervenbahn oberhalb des Hinterbeinganglions.*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
225 E	12	12	—	—	—	—
226 E	12	12	—	—	—	57
227 E	12	12	—	—	—	92
228 E	12	12	—	—	—	57
229 E	12	12	—	—	—	—
230 E	12	12	—	—	—	57

Tabelle 17. *Versuchsreihe XII. Versuch a: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Kopf-Prothoraxgelenkhaut (dorsal).*

Tier Nr.	Beobachtung der ersten Symptome nach Stunden	Lokalsymptome nach Stunden	Allgemeine Symptome nach Stunden		Lähmungen nach Stunden	Exitus nach Stunden
			aufsteigend	absteigend		
30 F	5	5	5	6	—	70
Versuch b: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an alle 6 Tarsenglieder.						
24 C	$3^1/_2$	—	$3^1/_2$	$3^1/_2$	5	22
Versuch c: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Femur-Tibiagelenkhaut des linken Mittelbeines.						
25 D	27	27	36	—	—	—
Versuch d: Anbringung von 10%iger DDT-Vaseline an die Hüftgelenkhaut des linken Mittelbeines.						
26 D	$3^1/_2$	27	$3^1/_2$	63	44	—

(Versuchsreihe XI, 3) vorgenommen (Tabellen 14 und 16), außerdem Einzelversuche mit Anbringung an die Kopf-Prothoraxgelenk-, an die Femur-Tibiagelenk- und an die Hüftgelenkhaut des linken Mittelbeines, sowie an alle 6 Tarsen durchgeführt (Tabelle 17).

Da diese Versuche in analoger Weise wie bei den oben beschriebenen verliefen und kleine grundlegenden Abweichungen zeigten, kann von ihrer Darstellung im einzelnen abgesehen werden. Sie werden daher nur in der tabellarischen Übersicht vorgelegt.

Ebenso wurden die Versuche mit Quetschung des Hinterbeinganglions (Versuchsreihen VIII, 2, X, 2 und XI, 2) an Stelle der Durchtrennung der Nervenbahn nicht weiter verfolgt, nachdem sich ergeben hatte, daß mit der Quetschung die totale Ausschaltung des Ganglions nicht garantiert wird. Diese Versuche werden daher auch nur tabellarisch erwähnt (Tabellen 7, 12 und 15).

Versuchsreihe XIII: Einbringung von 10%iger DDT-Vaseline in die Körperflüssigkeit. Tiere Nr. 231—235F.

Während des 96stündigen Versuches traten bei keinem Tiere Erscheinungen auf, die auf eine DDT-Vergiftung hindeuteten. Alle Tiere verhielten sich auch über die Versuchszeit hinaus normal. Für diese Versuchsreihe wurde unter Eröffnung des Panzers die dorsale Mesothoraxseite gewählt, weil hier keine Nervenbahnen verlaufen.

IV. Besprechung.

Aus den Versuchen ergibt sich folgendes:

1. Die Körperflüssigkeit löst den Giftstoff nicht (Versuchsreihen I und XIII), ein Transport auf diesem Wege kann ausgeschlossen werden.

2. Auch die Einbringung von DDT in die Muskelsubstanz (Versuchsreihe II) ergibt keine Vergiftungserscheinungen. Die Abstoßung der behandelten Beine bei 8 Tieren beruht nicht auf Giftwirkung, sondern ist als Reaktion auf den gesetzten Reiz zu werten.

3. Die Kontrollversuche 31A und 22A zeigen, daß die Wirkungen nicht durch die angewendeten Lösungsmittel Benzol und Vaseline, sondern durch den Giftstoff hervorgerufen worden sind.

4. DDT erzeugt nur Giftwirkungen, wenn es mit dem Nervensystem in Berührung kommt. Es ist also ein Nervengift.

5. Es besteht kein grundlegender Unterschied, ob der Giftstoff in Substanz oder in Salbenform appliziert wird; lediglich in zeitlicher Hinsicht ist festzustellen, daß die Applikation in Salbenform den Eintritt der Giftwirkung offenbar wesentlich beschleunigt.

6. Wird ein Kontakt mit dem Nervensystem hergestellt, dann breitet sich der Giftstoff über das ganze Nervensystem mit den beschriebenen typischen Erscheinungen aus, Der Ablauf der Vergiftungserscheinungen besteht in lokalen und allgemeinen Nervenreaktionen, dergestalt, daß überwiegend zunächst lokale und danach allgemeine Wirkungen auftreten. Das Vergiftungsbild läßt auf- und absteigende Wirkungen erkennen. Die einzelnen Ganglien sind nicht einander übergeordnet, sondern stehen gleichwertig nebeneinander.

7. Durch die Ergebnisse der Versuchsreihen VIII, 3, IX, 2, X, 3 und XI, 3 (Versuche mit durchtrennter Nervenleitung) wird besonders deutlich erwiesen, daß das Nervensystem allein Träger der Vergiftung ist; denn in allen diesen Fällen blieben die Vergiftungserscheinungen auf die nerval isolierten Körperteile beschränkt. Damit dürfte die Ansicht von Domenjoz, daß ein subepidermales Ganglienzellenmaschenwerk Träger der Kontaktwirkung sei, zumindest für Stabheuschrecken widerlegt sein, wobei es offenbleiben kann, ob ein solches Maschenwerk bei Stabheuschrecken überhaupt vorhanden oder ob es für die Auslösung der Giftwirkungen nicht geeignet ist. Daß die Giftwirkungen nicht über ein solches Maschenwerk zustande gekommen sind, zeigen sowohl die negativen Ergebnisse der Versuchsreihen I und XIII und der Versuchsreihe II als auch der positive Erfolg der Versuchsreihen X und XI. Denn da bei Einbringung des Giftstoffes in die Körperflüssigkeit oder in die Muskulatur bei der Schnittführung die Haut durchtrennt wird, müßten dabei auch Stellen des subepidermalen Maschenwerkes getroffen werden, wodurch unbedingt dessen Kontakt mit dem Giftstoff herbeigeführt würde. Gleichwohl wurde in diesen Fällen keine Giftwirkung erzielt. Wenn die Gelenkversuche zu positiven Ergebnissen führten, so ist dies durch unmittelbare Verbindung ihrer Häute mit dem Nervensystem bedingt. Mit hinreichender Sicherheit erweisen schließlich die Versuchsreihen VIII, 3, IX, 2, X, 3 und XI, 3, daß für die Ausbreitung im Körper nur die Nervenbahn in Frage kommt.

Bereits A. von Muralt[18] hielt auf Grund der Befunde von Läuger, Martin und Müller[19], sowie Woodard, Nelson und Calvery[20] das DDT für ein besonders bezeichnendes Beispiel eines im Nerven wandernden Stoffes. Auch erwähnt er sonstige Angaben über den Transport wirksamer Substanzen auf der Nervenbahn seit den ersten derartigen Beobachtungen durch Marie und Morax[21], Hans H. Meyer und Ransom[22] am Tetanustoxin: für das Herpes- und Hundswutvirus von Goodpasture[23], für das Virus der Kinderlähmung von Fairbrother und Hurst[24], für das Virus der Poliomyelitis von Howe und Bodian[25], für das Thyroxin von Mansfeld[26].

Interessant ist die von Mansfeld mitgeteilte Erfahrung der Jäger, nach der die Ausbildung des Hirschgeweihs nach Verlust *eines* Hodens nur einseitig auf der entgegengesetzten Körperseite ausbleibt, was für den Transport des entscheidenden Hormons auf einem — vermutlich unterwegs gekreuzten — nervösen Wege spricht.

Die Meinung von Lichtwitz[27] über die Wanderung des Adrenalins im Nerven blieb bestritten (Meltzer[28]), wie übrigens auch solche über die Wanderung von Virusarten (Harvey[29], Mulder[30]).

Gewiß ist es für die Frage der Wanderung pharmakologischer Agentien im Nerven von großer Bedeutung, ob sie wasserlöslich oder

lipoidlöslich sind; zur Unterscheidung physiologischer Pharmaka solcher Art — der „Neurohumore" — hat G. H. Parker[31] die Begriffe der „Hydrohumore" und „Lipohumore" eingeführt. Mit Recht vertritt von Muralt[18] den Standpunkt, daß *beide* Arten an der neurohumoralen Übermittlung nervöser Reize beteiligt sein können. Für ihren *Transport* auf der Nervenbahn wird man allerdings wohl geneigt sein dürfen, zunächst *verschiedene* Strukturen oder Schichten der Nervenfasern ins Auge zu fassen. Zweifellos liegen hier jedoch noch unerledigte Probleme.

Darüber hinaus sieht es heute so aus, als ob „Nerv" und „Nerv" auch in dieser Hinsicht keineswegs gleichgestellt werden könnten. Nach I. Hoffmann und Lendle[17] ließ sich am Frosch keine Wanderung von DDT im Nerven nachweisen, während sie an der Stabheuschrecke und anderen Insekten wohl nicht zu bezweifeln ist. Offen bleibt allerdings noch der *Zeitfaktor*, über den Hoffmann und Lendle keine Angaben machen; Mansfeld[26] hatte für Thyroxin gefunden, daß die Zeiträume zur Durchwanderung längerer Nervenstrecken sehr beträchtliche sind und sich selbst beim Warmblüter nach *Tagen* bemessen. Immerhin bleibt unbestreitbar das eine bestehen, daß DDT am Frosch nach Einbringen unter die Haut mindestens eine viel raschere allgemeine Vergiftung erzeugte als wenn nur der Nervenweg offen blieb, während sie am Insekt umgekehrt *nur* über den Nervenweg und nicht von der Körperflüssigkeit aus zu erzielen war.

Zusammenfassung.

234 Stabheuschrecken wurden in verschiedener Weise mit DDT behandelt. Die Applikation erfolgte teils in Substanz, teils in Salbenform, und im letzteren Falle bei erhaltener und bei willkürlich unterbrochener Nervenleitung.

Zum Auftreten der Giftwirkung ist die Berührung des Giftstoffes mit Nerven erforderlich und sein Transport geht innerhalb der Nervenbahn vor sich.

Herrn Ob.-Reg. Rat Dr. Zacher möchte ich für die wertvolle Hilfe, die er mir bei der Beschaffung und Pflege der Versuchstiere geleistet hat, sowie Herrn Dr. Görlitz von der Versuchsanstalt Seehof der Firma Schering A.G. für die Überlassung der Tiere herzlich danken.

Literatur.

[1] Domenjoz, R.: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 952. — [2] Riemenschneider, R.: Pharmazie, Beih. 2, Erg.-Bd. 1. 1947. — [3] White, W. C., and Th. R. Sweeney: Publ. Health Rep. (Am.) **60**, 66 (1945). — [4] Neal, P. A., T. R. Sweeney, S. S. Spicer and W. F. v. Oettingen: Publ. Health Rep. (Am.) **61**, 403 (1946). — [5] Velbinger, H. H.: Dtsch. Gesdh.wes. **2**, 355 (1947). — [6] Mühlens, K.: Dtsch. med. Wschr. **1946**, 164. — [7] Emmel, L., u. M. Krüpe: Z. Naturforsch. **1**, 691

(1946). — [8] Neal, P. A., and W. F. v. Oettingen: Soap a. Sanitary Chemicals **1946**. — [9] Neal, P. A., W. F. v. Oettingen, R. C. Dunn and N. E. Sharpless: Publ. Health Rep. (Am.) Suppl. **183** (1945). — [10] Spicer, S. S., T. R. Sweeney, W. F. v. Oettingen, R. D. Lillie and P. A. Neal: Vet. Med. **42** (1947). — [11] Bordas, M. L.: Contribution a l'étude de quelques points d'anatomie interne des Phyllies. Marseille: Institut Colonial 1907. — [12] Buddenbrock, W. v.: Biol. Zbl. **41** (1921). — [13] Marshall, W. S., u. H. H. Severin: Arch. Biontol. **1**, 215 (1906). — [14] Riemenschneider, R.: Dtsch. Gesdh.wes. **11**, 56 (1947). — [15] Schmeil, O.: Leitfaden der Tierkunde, S. 273. 1933. — [16] Neal, P. A., and W. F. v. Oettingen: Med. Ann. Distr. Columbia (Am.) **15** (1946). — [17] Hoffmann, Irmgard, u. Ludwig Lendle: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **205**, 223, 230 (1948). — [18] Muralt, A. v.: Die Signalübermittlung im Nerven, S. 151 2. Basel: Birkhäuser, 1946. — [19] Läuger, P., H. Martin u. P. Müller: Helvet. chim. Acta **27**, 892 (1944). — [20] Woodard, G., A. A. Nelson and H. O. Calvery: J. Pharmacol. (Am.) **82**, 152 (1944). — [21] Marie et Morax: Ann. Inst. Pasteur, Par. **16**, 818 (1902). — [22] Meyer, H. H., u. S. W. Ransom: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **49**, 369 (1903). — [23] Goodpasture, E. W.: Amer. J. Path. **1**, 1, 547 (1925). — [24] Fairbrother, R. W., and E. W. Hurst: J. Path. a. Bacter. **33**, 17 (1930). — [25] Howe, H., and D. Bodian: Neural Mechanisms in Poliomyelitis. New York 1942. — [26] Mansfeld, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 241 (1939). — [27] Lichtwitz, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **58**, 221 (1908); **65**, 214 (1911). — [28] Meltzer, S.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **59**, 458 (1908). — [29] Harvey, A. M.: J. Physiol. (Brit.) **96**, 348 (1939). — [30] Mulder: Acta neerld. Morph. norm. et path. **1**, 289 (1938). — [31] Parker, G. H.: Neurohormone als Aktivatoren von Chromatophoren. Übersetzt von Luise Sprengel, Abhandlungen zur exakten Biologie, H. 2, S. 1, herausgeg. v. L. von Bertalanffy. Berlin: Gebrüder Borntträger 1941.

Die Literaturstellen [19], [20], [21], [23], [24], [25], [29] und [30] wurden nach v. Muralt [18] und Mansfeld [26] zitiert, da die Originalarbeiten zur Zeit in Berlin nicht erreichbar sind.

Prof. Dr. W. Heubner, Berlin-Dahlem, Garystr. 9.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 352—362 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz).

Über den Hypertensinogengehalt des Blutes bei eiweißarmer Ernährung*. (Eiweißmangel und Hypotonie.)

Von

Günther Kroneberg, Hans-Joachim Schümann und Wolfgang Ocklitz.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1948.)

Der Wirkungsmechanismus des zuerst von Tigerstedt und Bergmann[1] beschriebenen blutdrucksteigernden Prinzips der Nierenrinde —„*Renin*" — wurde durch amerikanische Untersuchungen[2] in dem Sinne aufgeklärt, daß die pressorische Wirksamkeit des Renins wenigstens zum Teil auf seinem *Fermentcharakter* beruht, der es befähigt, einen im Blut vorhandenen pharmakologisch unwirksamen Eiweißkörper — „*Hypertensinogen*" — in blutdrucksteigerndes „*Hypertensin*" umzuwandeln.

$$\text{Hypertensinogen} \xrightarrow[\text{(Ferment)}]{\text{Renin}} \text{Hypertensin}$$

Seit längerer Zeit wird dieser Renin-Hypertensinmechanismus mit der *renalen Hypertonie* des Menschen und dem bei experimenteller Drosselung der Nierenarterie am Tier auftretenden Hochdruck in ursächliche Beziehung gebracht, wenn auch neuere amerikanische Arbeiten[3] es wahrscheinlich machen, daß außer Renin noch andere Faktoren für den pathologisch erhöhten Blutdruck mit verantwortlich sind und die nach Renininjektionen auftretenden Effekte nicht ausschließlich auf seine Fermentwirkung zurückgeführt werden können. Die Mitbeteiligung des Renins am Zustandekommen der renalen Hypertonie hätte man sich so vorzustellen, daß es im Gefolge von Durchblutungsstörungen in der Niere, einer „Ischämie" des Nierengewebes, zu einer vermehrten Abgabe von Renin ans Blut kommt und damit zu einer erhöhten fermentativen Umwandlung von Hypertensinogen in Hypertensin.

In kürzlich erschienenen Veröffentlichungen von P. Holtz und Mitarbeitern[4] wird die Möglichkeit diskutiert, daß dem Renin als

* Über die Ergebnisse wurde von P. Holtz auf der Frankfurter Tagung der Physiologischen Chemiker im September 1948 berichtet. Siehe auch die vorläufige Mitteilung von P. Holtz mit G. Kroneberg, H.-J. Schümann und W. Ocklitz: „Eiweißmangel und Hypotonie". Klin. Wschr. **1949**, 338.

körpereigenem Wirkstoff nicht nur *pathologische* Bedeutung, sondern auch *physiologische* Bedeutung für die Regulation des normalen Blutdrucks zukomme. Diese Vorstellung findet eine Stütze in neueren anatomischen Untersuchungen[5] über den „*juxtaglomerulären Apparat*" der Niere, die für das Vorkommen innersekretorischen Gewebes zwischen den afferenten und efferenten Arteriolen der Glomeruli sprechen, dessen physiologische Funktion vielleicht in der Produktion und Sekretion von Renin besteht. — Die Berücksichtigung des *Mechanismus* der Reninwirkung führt zu der Annahme, daß für das Ausmaß der Wirkung, d. h. für die Blutdruckhöhe nicht nur die *Fermentmenge* — Renin —, sondern auch die Menge des zur Verfügung stehenden *Substrates*, des im Blut vorhandenen Hypertensinogens, von ausschlaggebender Bedeutung sein muß. Diese Annahme liegt der in den schon erwähnten Untersuchungen von P. Holtz[4] der sog. „Tachyphylaxie" der Reninwirkung gegebenen Deutung im Sinne einer Erschöpfung der Hypertensinogenvorräte des Blutes durch wiederholte Renininjektionen zugrunde. Hält die Resynthese von Hypertensinogen nicht Schritt mit seinem fermentativen Verbrauch, so muß es über kurz oder lang zu einem Erlöschen der Fermentwirkung kommen. Hypertensinogen, das Substrat der Reninwirkung, besitzt Eiweißnatur. Die Synthese und Resynthese von Hypertensinogen wird wie diejenige anderer Bluteiweißkörper auf die regelmäßige Zufuhr der an seinem Aufbau beteiligten Aminosäuren mit dem Nahrungseiweiß angewiesen sein. Wiederholt beobachtete „Reninversager" an eiweißarm ernährten Versuchstieren wurden dementsprechend mit einem Hypertensinogenmangel erklärt[4]. Die weiter oben begründete Auffassung des Renin-Hypertensinsystems als eines an der Aufrechterhaltung des normalen Blutdrucks beteiligten physiologischen Regulationsmechanismus legte es deshalb nahe, die beim Menschen unter dem Einfluß mangelhafter Eiweißzufuhr auftretende *Hypotonie* mit einem Hypertensinogenmangel des Blutes in Zusammenhang zu bringen.

Wir haben Untersuchungen gemacht über den *Hypertensinogengehalt* des Blutes von Patienten mit abnorm niedrigen Blutdruckwerten, bei denen über längere Zeit hin eine eiweißarme Ernährung bestanden hatte, und bei denen zum Teil auch andere klinische Symptome des Eiweißmangels vorlagen.

Die *Methode* der Hypertensinogenbestimmung bestand darin, Renin auf Patientenserum einwirken zu lassen und das fermentativ gebildete Hypertensin an biologischen Testobjekten gegen blutdrucknormale Vergleichsfälle auszutesten. Aus Mangel an Katzen und Kaninchen konnte die nächstliegende Testreaktion, die *Blutdrucksteigerung*, nur in einzelnen Fällen benutzt werden. Für die meisten Versuche wurde von der *darmerregenden* Wirkung des Hypertensins Gebrauch gemacht:

als Testobjekt diente der isolierte *Meerschweinchendarm*. Dieses Testobjekt erwies sich auch deshalb als besonders vorteilhaft, weil es weit empfindlicher als der Blutdruck der größeren Versuchstiere auf Hypertensin reagiert und es somit ermöglicht, mit relativ kleinen Blut- bzw. Serummengen auszukommen.

Renindarstellung. Wegen der dem Renin zukommenden *Artspezifität der Wirkung*, die vermutlich auf dem von Tierart zu Tierart verschiedenen chemischen Aufbau seines Substrats —, des Eiweißkörpers Hypertensinogen — beruht, wurden für die Renindarstellung ausschließlich *menschliche* Nieren — möglichst frisches Leichenmaterial — verwandt. Die Darstellung des Renins erfolgte nach der in früheren Arbeiten von P. Holtz angegebenen Methode aus Azetontrockenpulver.

Beispiel. 20 g Trockenpulver werden mit 100 cm³ 1%iger NaCl-Lösung extrahiert, der Rückstand nochmals mit 50 cm³. Die vereinigten Extrakte werden zur Ausfällung von Ballasteiweiß mit 2—3 cm³ Eisessig versetzt. Die nach dem Zentrifugieren überstehende Lösung wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, der abzentrifugierte Niederschlag in 20 cm³ aqua dest. aufgenommen und in Zellophanschläuchen 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Die durch Zusatz von 20% NaCl-Lösung auf einen Kochsalzgehalt von 0,9% gebrachte Lösung dient als Reninpräparat.

Hypertensinbildung. 10 cm³ Serum von Patienten und gesunden Vergleichspersonen, auf 37° vorgewärmt, werden mit 2—4 cm³ Reninlösung versetzt und 25 Min. lang bei 37° im Brutschrank gehalten. Durch Zusatz von 30 cm³ Alkohol wird enteiweißt, der Niederschlag abgenutscht und das alkoholhaltige klare Filtrat bei 50° im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 5 cm aqua dest. aufgenommen, die meist gelblich gefärbte, trübe Lösung entsprechend den Angaben von P. Holtz mit einigen Tropfen 10%iger HCl auf p_H 4—5 gebracht und 2mal mit Äther ausgeschüttelt. Die jetzt farblose wässerige Schicht enthält das Hypertensin. Nach Neutralisation mit NaOH wird sie biologisch ausgetestet.

Austestung. Sie erfolgte in einigen Versuchen am Blutdruck der mit Pernocton narkotisierten Katze, die zweckmäßig 10 Min. vor Beginn der Auswertung 8 mg je Kilogramm Kokain. hydrochloricum intramuskulär erhält, da die Reaktionsfähigkeit hierdurch erhöht wird. In den meisten Versuchen diente das im Tyrodebad von 20 cm³ aufgehängte Meerschweinchenrektum als Testobjekt, das im allgemeinen schon auf 0,1—0,2 cm³ der 10fach verdünnten Hypertensinlösung (siehe oben) mit einer deutlichen Kontraktion reagierte.

Vorversuche.

1. Inkubationszeit und Hypertensinausbeute.

Die in dem Versuchsansatz Serum + Renin nach einer bestimmten Inkubationszeit vorhandene Hypertensinmenge ist die Resultante aus 2 gegensinnig verlaufendenden Reaktionen: der Hypertensin*bildung* durch Renin und der Hypertensin*zerstörung* durch die im Serum vorhandene Hypertensinase. Da innerhalb bestimmter Grenzen, die durch die im Serum enthaltenen Substratmengen, also durch die Hypertensinogenmengen des Serums gezogen sein dürften, mit zunehmender Inkubationszeit die Hypertensinausbeute ansteigt, ist zu schließen, daß die *Bildung* schneller erfolgt als die *Zerstörung*. Aus früheren

Untersuchungen war uns bekannt, daß eine Inkubationszeit von 25 Min. maximale Ausbeuten ergibt (Abb. 1, *1*). Bei längeren Einwirkungszeiten gewinnt dann die zerstörende Wirkung der Hypertensinase die Oberhand bzw. Alleinherrschaft, so daß z. B. nach 120 Min. der Versuchsansatz nicht mehr stärker wirkt als die Kontrolle, in der das Serum sofort nach Zusatz von Renin enteiweißt worden war und die in diesem Versuch, in dem die unverdünnten „Hypertensinlösungen" in das Darmgefäß gegeben wurden, auch eine geringfügige Wirkung ausübt (Abb. 1 *K* und *2*). Schaltet man die *Hypertensinasewirkung* aus, indem man das Serum vor dem Reninzusatz mit Phosphorsäure ansäuert, so findet sich auch nach langer, 2stündiger Versuchsdauer eine Hypertensinmenge, die mit der im neutralenNormalansatz während der optimalen Inkubationszeit entstandenen vergleichbar ist (Abb. 1, *3*).

Abb. 1. *Inkubationszeit und Hypertensinausbeute.* Isoliertes Meerschweinchenrektum 20 cm³ Tyrode. 0,2 cm³ Hypertensinlösung (unverdünnt) aus Schweinerenin und Schweineserum. *K* = Kontrolle (Renin hat nicht eingewirkt). *1* = Renin hat 25 Min. eingewirkt. *2* = Renin hat 120 Min. eingewirkt. *3* = Renin hat 120 Min. eingewirkt, aber bei p_{H_4} (Zusatz von Phosphorsäure zum Serum). — In *2* ist das zunächst entstandene Hypertensin durch die Hypertensinase zerstört worden. In *3* wurde die Wirkung der Hypertensinase durch Ansäuerung des Serums ausgeschaltet.

2. Reninmenge und Hypertensinausbeute.

Für die quantitative Umwandlung des im Serum vorhandenen Hypertensinogens ist neben der *Inkubationszeit* die *Fermentmenge* (Reninmenge) von Bedeutung. Da wir nicht mit einem standardisierten, abwägbaren Fermentpräparat arbeiten konnten, sondern uns beinahe für jeden Versuch unsere „Reninlösungen" aus gerade zur Verfügung stehendem, sehr verschiedenartigen menschlichen Nierenmaterial herstellen mußten, waren *Vorversuche* notwendig zur Feststellung der „Reninmenge", welche einen maximalen Umsatz des im Normalserum enthaltenen Hypertensinogens gewährleistete. Die so ausgetestete Fermentmenge wurde dann im *Hauptversuch* angewandt. Die Abb. 2 zeigt das Ergebnis eines solchen „Vorversuchs", in dem 2 cm³ Reninlösung offenbar nicht ausreichten, um die gesamte Hypertensinogenmenge in 10 cm³ Serum umzusetzen, da die doppelte Fermentmenge (4 cm³) eine sowohl am Blutdruck als am Darm nachweisbare deutlich höhere Ausbeute an wirksamem Hypertensin gab. Die Hypertensinase war in diesem Versuch durch Ansäuern des Serums ausgeschaltet.

Hauptversuche.

Im Versuch der Abb. 3 wurden die Seren von 3 Normalpersonen (Nr. 1, 3 und 4) und von 1 Patienten mit klinisch manifesten Symptomen einer eiweißarmen Ernährung untersucht (Nr. 2). Der *Blutdruck* ist bei Fall 2 abnorm niedrig, und der *Eiweißgehalt* des Serums ist bei normalem Albumin-Globulinquotienten stark vermindert. Die Hypertensinausbeute aus dem Serum dieses Patienten nach Inkubation mit Renin ist weit geringer als in den Vergleichsfällen mit *normalem* Blutdruck und *normalem* Eiweißgehalt. Selbst die 4fache Menge

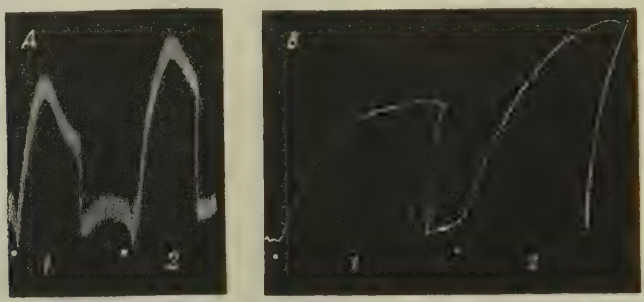


Abb. 2. *Reninmenge und Hypertensinausbeute.* Versuchsansatz: 10 cm³ Menschenserum + 2 cm³ bzw. 4 cm³ Reninlösung (Inkubationszeit 25 Min.). — *A.* Blutdruckwirkung Katze, 1,9 kg Pernoctonnarkose (0,8 g/kg intramuskulär). Kokain. hydrochlor. (8 mg/kg subkutan). Intravenöse Injektion von 2 cm³ unverdünnter Hypertensinlösung (bei *1* Ansatz mit 2 cm³, bei *2* Ansatz mit 4 cm³ Reninlösung). — *B.* Darmwirkung. Meerschweinchenrektum in 20 cm³ Tyrode. Zusatz von 0,6 cm³ der 5fach verdünnten Hypertensinlösung. *1* = Ansatz mit 2 cm³ Reninlösung. *2* = Ansatz mit 4 cm³ Reninlösung.

„Hypertensinlösung" von Fall 2 (2 cm³ anstatt 0,5 cm³) genügt nicht, eine gleichstarke Darmkontraktion hervorzurufen wie in den Normalfällen 1, 3 und 4, die in der Wirksamkeit untereinander sehr gut übereinstimmen. Die durch den Eiweißmangel in der Nahrung verursachte *allgemeine* Hypoproteinämie ist offenbar mit einem Mangel an dem *besonderen,* spezifischen Blutprotein „Hypertensinogen" verbunden, so daß im *Reagensglas* bei der Inkubation mit Renin weniger darmerregendes Hypertensin entstand, und vielleicht im *Körper des Patienten* das Reninferment der Nierenrinde in der Blutbahn aus Mangel an Substrat nicht genügend Hypertensin bilden konnte, um den Blutdruck auf normaler Höhe zu halten.

Wir haben das Blut des Patienten nach 3wöchigem Klinikaufenthalt und eiweißreicher Ernährung untersucht. Das Ergebnis ist im Versuch der Abb. 4 enthalten, in dem er den Fall 4 darstellt. Unter der Behandlung waren *Blutdruck* und *Bluteiweißgehalt* deutlich angestiegen, und der *Hypertensinversuch* am Darm zeigt, daß mit den anderen Serumeiweißkörpern auch das Hypertensinogen vermehrt worden sein muß, denn das Serum des Patienten gibt jetzt mit Renin eine ebenso

große Ausbeute an darmerregendem Hypertensin wie die Seren der Normalfälle Nr. 3, 5 und 6. Der jetzt etwas abgesunkene *Albumin-Globulinquotient* — von 1,86 auf 1,38 — weist darauf hin, daß es während der klinischen Behandlung vornehmlich zu einer Resynthese von *Globulinen* gekommen ist.

Nimmt man eine grobe Fraktionierung der Serumeiweißkörper mit Ammoniumsulfat vor, so findet man, daß das Hypertensinogen sich fast gleichmäßig auf die bei $^1/_2$- und $^1/_1$-Sättigung ausfallenden Fraktionen verteilt (Abb. 5).

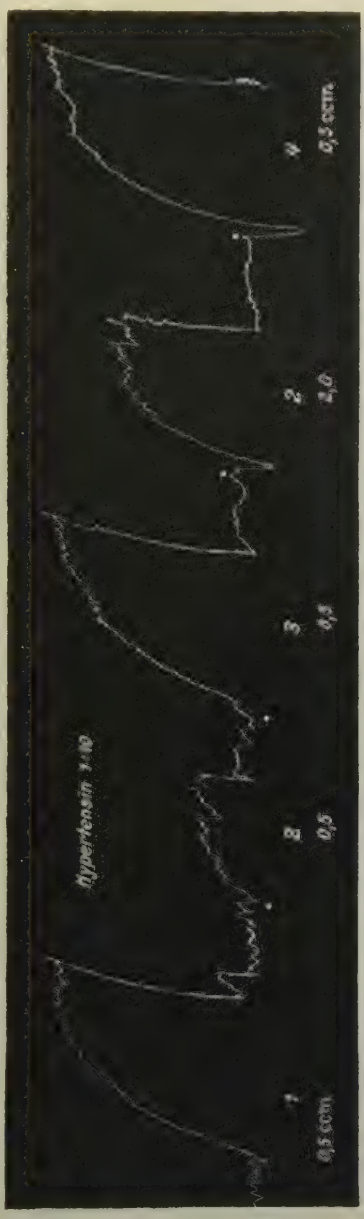


Abb. 3. Darmwirkung von Hypertensin aus 10 cm³ Menschenserum, das 25 Min. lang mit 2 cm³ Renin aus menschlicher Niere bei 37° inkubiert worden war. *1*, *3*, *4* Normalpersonen, *2* Hungerödem. Isoliertes Meerschweinchenrektum.

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
1	H.	♀	16	120/80	7,92	2,0
2	B.	♂	24	90/65	5,23	1,86

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
3	S.	♂	40	140/80	7,92	2,0
4	W.	♂	36	120/75	8,2	1,6

Methodik. 100 cm³ Schweine- oder Rinderserum werden fraktioniert gefällt, die bei $^1/_2$- und $^1/_1$-Sättigung ausfallenden Fraktionen 36 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Danach werden beide Fraktionen mit dest. Wasser auf gleiche Volumina und durch Zusatz von 20%iger Kochsalzlösung auf einen NaCl-Gehalt von 0,9% gebracht. Nach Zugabe von Renin werden die Ansätze auf Hypertensin aufgearbeitet und am Blutdruck der Katze bzw. am Meerschweinchendarm ausgewertet.

Der „pathologische Fall" im Versuch der Abb. 4 ist Nr. 2: abnorm niedriger Blutdruck, dystrophisch und fast kachektisch nach lang

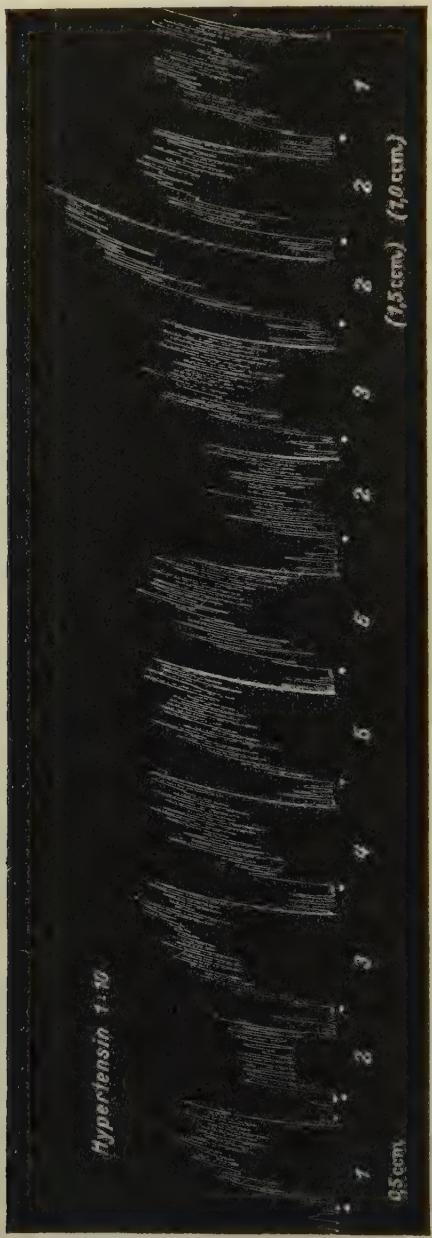


Abb. 4. Darmwirkung von Hypertensin aus 10 cm³ Menschenserum. *1, 3, 6* Normalpersonen, *2* trockene Dystrophie (kachektisch), *4* Hungerödem (siehe Abb. 3, Fall *2*) nach 3wöchiger Behandlung, *5* Hypotonie nach Typhus.

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
1	K.	♀	47	110/60	6,67	1,0
2	K.	♀	31	75/55	7,26	0,32
3	A.	♂	37	115/80	7,40	1,8

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
4	B.	♂	24	105/80	6,10	1,38
5	O.	♀	21	75/50	6,67	1,0
6	L.	♀	51	140/60	6,73	2,0

dauernder eiweißarmer Ernährung. Die Austestung am Darm ergibt stark verminderten Hypertensinogengehalt des Serums — erst die doppelte Menge (1 cm³) „Hypertensin“ hat die gleiche Wirkung wie

bei den Normalfällen, die 3fache Menge (1,5 cm³) hat eine stärkere Wirkung. Trotz zu niedrigen *Blutdrucks* und trotz *Hypertensinogenabnahme* ist der *Gesamteiweißgehalt* des Blutes normal (siehe Tabelle zu Abb. 4). Die Erklärung dürfte in dem abnorm kleinen *Albumin-*

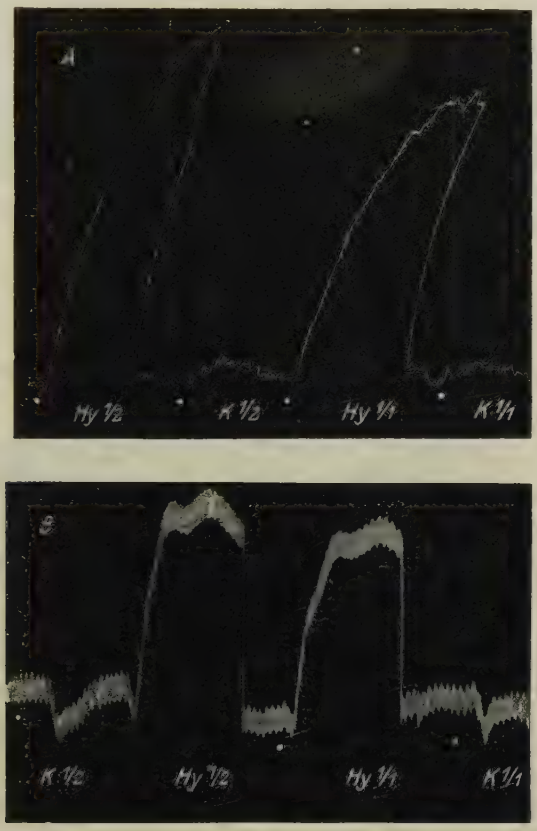


Abb. 5. Verteilung des Hypertensinogens auf die „Globulin"- und „Albumin"-Fraktion des Serums. — *A Meerschweinchendarm.* Hy $^1/_2$ = 0,2 cm³ Hypertensin 1:10 aus $^1/_2$-Sättigungsfraktion (Globulin-Fraktion). K $^1/_2$ = 0,2 cm³ Kontrollansatz, in dem Renin nicht einwirkte. Hy $^1/_1$ = 0,2 cm³ Hypertensin 1:10 aus $^1/_1$-Sättigungs-Fraktion (Albumin-Fraktion). K $^1/_1$ = 0,2 cm³ Kontrollansatz, in dem Renin nicht einwirkte. — *B Katzenblutdruck.* Intravenöse Injektion von 1,0 cm³ unverdünnter Hypertensinlösung. Kontrollsatz wie unter A.

Globulinquotienten von nur 0,32, also in der außerordentlich starken Verarmung des Blutes an *Albuminen* liegen. Wenn das Hypertensinogen auch bei der oben geschilderten groben Fraktionierung zu einem beträchtlichen Teil in die „Globulinfraktion" eingeht, so scheint es doch bezüglich des Bedarfs an *exogenen Aminosäuren* für seinen chemischen Aufbau anspruchsvoller zu sein als die Globuline und den

Tabelle 1. *Verminderter Hypertensinogengehalt des Blutes.*

Namen	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
1. Verminderter Eiweißgehalt mit zum Teil normalen oder fast normalen Quotienten.					
B.	♂♀♀♂♂♀	24	90/65	5,23	*1,86*
S.		50	90/65	5,34	0,20
N.		70	90/55	5,65	0,20
H.		84	110/65	6,00	*1,10*
O.		57	80/40	6,10	0,37
K.		52	110/60	6,27	0,50
W.		57	75/50	6,52	0,73
S.		69	105/75	6,59	0,49
2. Normaler Eiweißgehalt mit erniedrigten Quotienten.					
S.	♂♀♀♀♀	27	100/68	7,05	0,60
H.		39	85/55	7,07	0,39
K.		31	75/55	7,26	0,32
G.		70	110/70	7,87	0,72
S.		38	85/60	8,15	0,15

Albuminen mehr zu gleichen, so daß, wenn es wie im vorliegenden Fall, aus Mangel an geeigneten Bausteinen zu einer so starken Beeinträchtigung der *Albuminbildung* kommt, auch die *Hypertensinogensynthese* — selbst bei normalem Gesamteiweiß, also übernormaler Globulinbildung — in Mitleidenschaft gezogen wird.

Mit besonderem Nachdruck möchten wir auf den in der Abb. 4 unter Nr. 5 dargestellten Fall hinweisen, bei dem sich ein gleich niedriger Blutdruck wie bei Fall 2 und ein noch niedrigerer Bluteiweißgehalt findet, bei dem aber offenbar trotzdem genügend Hypertensinogen vorhanden ist, um im Versuch am Darm eine Reaktion normalen Ausmaßes zu geben. Der *Albumin-Globulinquotient* ist 3mal größer als im Fall 2. Ein Vergleich von Nr. 5 mit Nr. 1 — bis auf die verschiedene Blutdruckhöhe *Übereinstimmung* in allen Punkten: *Eiweißgehalt*, *Quotient* und *Hypertensinogengehalt* (Darmwirkung) — macht dann vielleicht besonders deutlich, daß der abnorm niedrige Blutdruck des Falles 5 seine Ursache *nicht* in einem Eiweiß- und Hypertensinogenmangel haben kann. Es handelt sich um eine Patientin in sehr gutem Ernährungszustand nach einem kürzlich überstandenen Typhus.

Die Abb. 6 und 7 geben noch einige Beispiele für solche Fälle, in denen anamnestisch erwiesene Eiweißmangelernährung und klinische Symptome des Eiweißmangels, sowie verminderter *Eiweißgehalt* des Blutes oder abnorm niedriger *Albumin-Globulinquotient* bei eventuell normalen Werten für Gesamteiweiß mit einem Hypertensinogenmangel des Serums und einem abnorm niedrigen Blutdruck vergesellschaftet sind, — in denen es deshalb vielleicht berechtigt ist, den diätetisch bedingten Mangel an Hypertensinogen in *ursächliche* Beziehung zur Hypotonie zu bringen.

Die *Tabelle 1* gibt dann schließlich noch einmal einen Überblick über eine größere Anzahl von uns untersuchter Fälle, die unter dem Gesichtspunkt geordnet sind, daß ein im Darmversuch nachweisbarer

Abb. 6. Darmwirkung von Hypertensin aus 10 cm³ Menschenserum. Isoliertes Meerschweinchenrektum, 0,2 cm³ Hypertensinlösung 1:10. 1 und 4 Normalfälle, 2 und trockene Dystrophie (stark kachektisch).

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
1	S.	♂	20	115/75	7,05	2,0
2	Kr.	♀	48	100/60	6,27	0,5
3	W.	♂	57	75/50	6,5	0,73
4	E.	♀	22	130/85	6,02	1,7

Abb. 7. Darmwirkung von Hypertensin aus 10 cm³ Menschenserum. Meerschweinchenrektum, Tyrode 20 cm³, 0,2 cm³ Hypertensin 1:10.

Nr.	Name	Geschlecht	Alter Jahre	Blutdruck	Eiweiß in Prozent	Albumin Globulin
1	K.	♂	44	120/65	7,78	1,6 (Normalfall)
2	O.	♀	37	80/40	6,1	0,37 (kachektisch)
3	R.	♂	52	130/65	6,61	2,0 (Normalfall)

Hypertensinogenmangel beobachtet wird: 1. bei *allgemeiner Hypotroteinämie,* auch wenn der Albumin-Globulinquotient *normal* ist, 2. bei pathologisch *niedrigem Quotienten,* auch wenn der *Gesamteiweißgehalt* des Blutes *normal* ist.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen gingen von der Vorstellung aus, daß dem Nierenferment „*Renin*", unter dessen Wirkung der Bluteiweißkörper

„*Hypertensinogen*" in blutdrucksteigerndes „*Hypertensin*" umgewandelt wird, *physiologische Bedeutung* für die Aufrechterhaltung der *normalen Blutdruckhöhe* zukomme. Die von dieser gedanklichen Grundlage aus vorgenommenen Untersuchungen zur Aufklärung der Beziehungen zwischen eiweißarmer Ernährung und pathologisch niedrigem Blutdruck ergaben Anhaltspunkte dafür, daß am Zustandekommen der durch Eiweißmangel bedingten *Hypotonie* ein *Mangel an* „*Hypertensinogen*" ursächlich beteiligt sein kann.

Der Hypertensinogengehalt des Serums war vermindert:

1. wenn die eiweißarme Ernährung zu einer *allgemeinen Hypoproteinämie* geführt hatte;

2. auch bei *normalem Gesamteiweißgehalt* des Blutes, wenn der *Albumin-Globulinquotient* stark *erniedrigt* war.

Bei der *Fraktionierung der Bluteiweißkörper* mit Ammoniumsulfat verteilt das Hypertensinogen sich zwar sowohl auf die durch $^1/_2$- als die durch $^1/_1$-Sättigung gewonnene Fraktion, scheint aber *konstitutionsmäßig den Albuminen näher* zu stehen als den Globulinen, indem bei mangelhafter Albuminbildung auch die *Synthese von Hypertensinogen* in Mitleidenschaft gezogen wird.

Literatur.

[1] Tigerstedt, R., u. P. G. Bergmann: Skand. Arch. Physiol. (D.) **8**, 223 (1898). — [2] Houssay, B. A. u. Mitarb.: J. Physiol. (Brit.) **94**, 281 (1938). — Page, J. H. u. Mitarb.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **39**, 214 (1938; **44**, 360 (1940). — J. exper. Med. (Am.) **73**, 7 (1941). — Braun-Menendez, E., J. C. Fasciolo, L. F. Leloir and J. M. Munoz: J. Physiol. (Brit.) **98**, 283 (1940). — [3] Haynes, F. W., L. Dexter and R. E. Seibel: Amer. J. Physiol. **150**, 198 (1947). Haynes, F. W., and L. Dexter: Amer. J. Physiol. **150**, 190 (1947). — Mylon, E. M. Lind and J. H. Heller: Amer. J. Physiol. **152**, 397 (1948). — [4] Holtz, P., K. Credner, F. Drenkhahn, G. Kroneberg u. E. Künzelmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 244 (1944/47). — Holtz, P.: Klin. Wschr. **1946/47**, 65. — Feyrter, F.: Virchows Arch. **306**, 135 (1940). — Klin. Wschr. **1943**, 175.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 363—371 (1949).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. U. Ebbecke).

Über die Wirkung neuer Adrenalinderivate auf die kleinsten oberflächlichen Hautgefäße des Menschen.

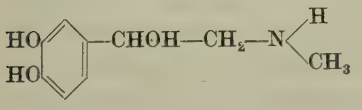
Von

Rudolf Kadatz.

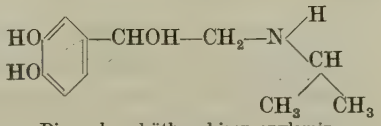
(Eingegangen am 10. Februar 1949.)

Eine große Zahl von Untersuchungen ist bisher über die Wirkung des Adrenalins auf die verschiedenen Gefäßabschnitte von Warm- und Kaltblütern angestellt worden. Beim Vergleich anderer Sympathikomimetika begnügt man sich häufig mit der Betrachtung von Stärke und zeitlichem Verlauf ihrer Blutdruckwirkung im Tierversuch (Spinalkatze), ohne sich dabei ein genaues Bild darüber machen zu können, in welcher Weise Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen und Blutspeicher an der dabei meist auftretenden Blutdrucksteigerung beteiligt sind, — ganz abgesehen davon, daß es sogar schwierig oder oft unmöglich ist, am Gesamtorganismus Herz- und Gefäßwirkung von kreislaufaktiven Pharmaka exakt voneinander zu trennen (Wezler und Thauer[1]).

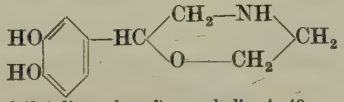
Die vorliegende Arbeit hat zur Aufgabe, die Wirkung zweier neuer Adrenalinderivate auf die kleinsten oberflächlichen Gefäße der menschlichen Haut zu prüfen. Es standen uns zu unseren Untersuchungen Aludrin und „A 40" als wichtigste Körper einer Reihe von Adrenalinabkömmlingen zur Verfügung, die in den chemischen Laboratorien der Firma C. H. Boehringer & Sohn, Ingelheim, synthetisiert worden sind. Die pharmakologische Prüfung des Aludrins ist nach anderen Gesichtspunkten bereits durch Rössler[2] und Konzett[3] erfolgt. Sie unterscheiden sich vom Adrenalin durch Einführung eines anderen Radikals an der Aminogruppe, d. h. statt des Methylrestes ist ein Isopropylrest beim Aludrin und ein 2-oxy-äthylrest beim A 40 eingeführt, wobei es beim A 40 unter Wasseraustritt zur Bildung eines Morpholinringes kommt:



Dioxyphenyl-äthanol-methylamin
Adrenalin



Dioxyphenyl-äthanol-isopropylamin
Aludrin



2 (3,4-dioxyphenyl)-morpholin A 40.

Beide Adrenalinderivate lagen kristallisiert vor und sind gut wasserlöslich. Zum Vergleich wurde das Adrenalin cryst. Pharm. Helv. V von Merck, Darmstadt, verwandt, das durch Zufügen von isomolekularen Salzsäuremengen in das salzsaure Salz überführt wurde. Die Lösungen wurden jeden Tag frisch zubereitet, da sie sich bei längerem Stehen an der Luft rötlich verfärben und nach einiger Zeit mit einer Abschwächung der Wirkung und mit dem Auftreten von durch Oxydation entstehenden Abbauprodukten gerechnet werden muß. Diese können als unerwünschte Nebenwirkung eine Hautreizung hervorrufen (v. Groer[4], Jakobs[5]).

Die Beobachtung der Wirkung gefäßaktiver Stoffe auf die oberflächlichen Hautgefäße ist gut möglich, wenn man sie mit Hilfe des elektrischen Stromes in die Haut einbringt. Die abblassende Wirkung des elektrophoretisch in die Haut eingebrachten Adrenalins auf die Hautgefäße wurde zum ersten Male von Leduc und Gonzalez Quijano Sanchez 1902 beschrieben und ist in ausgedehntem Maße von v. Dalmady[6] 1912 zum Studium der vasokonstriktorischen Reaktionen unter verschiedenen Bedingungen benutzt worden.

v. Groer und Hecht[7] haben 1917 eine Methode der quantitativen Wertbestimmung gefäßverengernder Mittel durch intrakutane Injektion ausgearbeitet und genaue Schwellenbestimmungen an der menschlichen Haut durchgeführt. Sie injizierten intrakutan in stets dieselbe Tiefe 0,1 cm^3 einer Adrenalinlösung in verschiedenen Verdünnungen. Die Schwelle, bei der eben noch eine abblassende Wirkung festzustellen war, lag bei einer Verdünnung von $1:10^8$—$1:10^{12}$. Es sollen dabei starke Verdünnungen eine kapillarerweiternde Wirkung zeigen und erst größere Adrenalindosen die bekannte vasokonstriktorische Wirkung haben, ein Befund, auf den später noch einzugehen sein wird. Um die Abblassung herum entsteht dabei — reflektorisch oder durch lokale Reizung bedingt — ein düsterroter Reaktionshof, der vor Abklingen der Abblassungsreaktion schwindet, während die früher blasse Innenzone eine nachfolgende Röte aufweist, die manchmal noch am nächsten Tage nachweisbar ist.

Es erscheint uns diese Methode als ein zu grober und unphysiologischer Eingriff für die Untersuchung von Substanzen, die in oft sehr starken Verdünnungen verwandt werden, bei dem die auftretende Wirkung durch die individuell verschiedene lokale Reaktion der Haut auf den Einstich selbst unerwünscht beeinflußt werden kann. Bei höheren Konzentrationen kann es andererseits zu unangenehmem Herzklopfen und zu Blutdrucksteigerung kommen. Entzündungen oder Nekrosen, wie sie v. Groer nach Injektion von höheren Adrenalinkonzentrationen sah, habe ich bei Anwendung der gleich näher zu beschreibenden Ebbeckeschen Methode ebensowenig beobachtet wie Jakobs[5], der damit 1936 Untersuchungen anstellte. Wir haben die

v. Groersche Methode zum Vergleich mit der von uns geübten verschiedentlich angewandt.

Die eintretende Wirkung wird mit dem bloßen Auge an der Veränderung der Hautfarbe abgelesen. Diese ist erfahrungsgemäß ein besserer Indikator für die Gefäßweite als kapillarmikroskopisch zu messende Veränderungen des Durchmessers einzelner Gefäße. Die Hautfarbe ist nach Ebbecke und Krogh[8] durch den Füllungsgrad der Papillenkapillaren und mehr noch des von Spalteholz[9] beschriebenen subpapillaren Plexus kleinster Venchen bedingt, von deren Weitenänderung die dem unbewaffneten Auge erscheinenden Farbreaktionen in erster Linie abhängen. Diese beiden Arten von Gefäßen sind es auch, an denen die elektrophoretisch eingeführten Substanzen zur Wirkung gelangen.

Methodik.

Bei der elektrophoretischen Einführung von Substanzen in die Haut werden die zu untersuchenden Stoffe, die teilweise dissoziieren und als Kationen vorliegen, teils als Ionen und teils als unzerlegte Moleküle von der Anode als differenter Flüssigkeitselektrode her eingebracht.

Als indifferente Elektrode wird ein Metallzylinder breitflächig von der ganzen Hand umfaßt. Die Flüssigkeitselektrode wurde von Ebbecke[10] aus einer zuerst von Munk angewandten Form entwickelt. Sie besteht aus einer beiderseits offenen Glasröhre von etwa 6 cm Länge und 16 mm Durchmesser, die in ein Stativ beweglich eingespannt ist. Sie kann bequem von oben her etwa auf die Volarfläche des auf dem Tisch aufliegenden Unterarmes der Versuchsperson aufgesetzt werden und schließt bei ausreichender Belastung so fest auf der elastisch nachgiebigen Haut an, daß sich ohne weiteres Flüssigkeit in die Röhre einfüllen läßt, ohne auszulaufen. Durch die obere Öffnung taucht als Stromzuführung eine unpolarisierbare Zink-Zinksulfatelektrode. Zum Entleeren des Röhrchens drückt man mit einem Becherglas dicht am unteren Elektrodenrand die Haut etwas herunter und läßt die Flüssigkeit herauslaufen.

Der Strom wird einer Anodenbatterie entnommen und ist durch Verwendung eines Schieberheostaten in Potentiometerschaltung jederzeit so zu variieren, daß trotz des während der Durchströmungszeit erst rasch und dann immer langsamer absinkenden scheinbaren Hautwiderstandes stets mit gleicher Stromstärke gearbeitet wird. Meist wurde eine Minute lang mit 2 mA durchströmt, so daß die Stromdichte 1 mA/cm² Hautfläche betrug. Die dazu erforderliche Spannung schwankte je nach dem angewandten Lösungsmittel und dem individuell verschiedenen Hautwiderstand zwischen 20 und 80 Volt, eingeschaltete Meßinstrumente erlaubten jederzeitige Kontrolle von Spannung und Stromstärke. Nach dem Ausschalten des Stromes wird die Elektrode rasch entfernt, die Haut abgetrocknet und beobachtet. Man vermeidet mit dieser Methode die Fehlerquellen der üblichen als Elektroden verwandten umwickelten feuchten Metallscheiben die durch mechanischen Druck und durch Polarisation und elektrolytische Veränderung der Flüssigkeit entstehen.

Als Lösungsmittel benutzten wir anfangs außer physiologischer Kochsalzlösung auch Aqua dest. Da aber auch reines Aqua dest. bisweilen schon eine merkliche Abblassung hervorruft und wegen der verschiedenen elektrischen Leitfähigkeit von physiologischer Kochsalzlösung und Aqua dest. die bei gleicher Stromstärke in die Haut eingebrachten Wirkstoffmengen nicht gleich groß sein

werden (ein wesentlicher Teil des Stromes wird in der physiologischen NaCl-Lösung durch die Na^+ und Cl^--Ionen transportiert), und endlich die Reizwirkung des Aqua dest. auf die Haut wesentlich größer ist, haben wir später nur noch physiologische Kochsalzlösung verwandt und die damit erzielten Ergebnisse hier besprochen.

Da sich die verwandten Substanzen in ihren Molekulargewichten nur unwesentlich voneinander unterscheiden, haben wir davon abgesehen, mit isomolekularen Mengen zu arbeiten, sondern haben gleiche Gewichtsmengen miteinander verglichen.

Die bei der Elektrophorese in die Haut gelangenden Substanzmengen sind sehr gering, es kann eine hohe Verdünnung viele Male nacheinander zur Durchströmung benutzt werden, ohne daß ein Nachlassen der Wirkungsstärke zu beobachten ist. Auch nimmt die Konzentration in der Haut von der Oberfläche zur Tiefe hin noch ab, so daß man annehmen kann, daß an den Gefäßen nur noch wenige Moleküle zur Wirkung gelangen.

Die subjektiven Erscheinungen während der Durchströmung sind ein mäßiges Jucken und Prickeln an der differenten Elektrode (Anode), die bis zu leichtem stechenden oder brennenden Schmerz gesteigert sein können und ein leichter kurzer Schlag bei der Stromöffnung.

Es wurde in allen Fällen die volare Seite des Unterarmes von Versuchspersonen im Alter von 20—30 Jahren benutzt und zur Einhaltung vergleichbarer Versuchsbedingungen bei möglichst gleichmäßiger Raum- und Hauttemperatur gearbeitet.

Versuchsergebnisse.

Um die Wirkung des Lösungsmittels von der der untersuchten Substanz abgrenzen zu können, wurden zunächst einige Leerversuche mit reiner physiologischer Kochsalzlösung gemacht. Es kann dabei sowohl eine Rötung des durchströmten Hautfeldes selbst auftreten, das durch den Druckring des Elektrodenglases deutlich begrenzt ist, als auch eine verschieden starke Umgebungsröte, die das Versuchsfeld als roten Saum von 0,5—1 cm Breite umgibt. Diese Rötung ist immer gleichmäßig flächenhaft im Gegensatz zu den kleinflächig beginnenden Abblassungen durch die vasokonstriktorischen Stoffe. Ihre Intensität ist sehr unterschiedlich nicht nur bei verschiedenen Versuchspersonen, sondern sie kann auch bei am gleichen Individuum wiederholten Versuchen recht verschieden ausfallen, bisweilen auch völlig fehlen. Sie dürfte als eine Reizwirkung des elektrischen Stromes auf die Haut aufzufassen sein, wobei dahingestellt bleibt, wieweit sie als Reflexerythem oder als direkte Gewebsreizung und Fortleitung durch ein peripheres Nervenfasernetz anzusehen ist. Für letztere Auffassung spricht die Gleichmäßigkeit und lange Dauer der Rötung. Diese Rötung ist schon beim Abheben der Elektrode sichtbar oder beginnt kurz danach, nimmt in den folgenden Minuten noch an Intensität zu und kann in einzelnen Fällen bis $1^1/_2$ Stunden andauern. Ihre variable Stärke dürfte mit der allgemeinen wechselnden vasomotorischen Erregbarkeit parallel gehen und man muß sie kennen, um sie nicht fälschlich als eine Wirkung oder Nachwirkung der untersuchten Adrenalinderivate anzusehen.

Die Gefäßwirkung der beiden genannten Substanzen Aludrin und A 40 und des damit verglichenen Adrenalins besteht in jedem Falle, sofern die Konzentration nur überschwellig ist, in einer Vasokonstriktion, die an einer Abblassung innerhalb des durchströmten Hautfeldes sichtbar wird. Unmittelbar nach dem Abheben der Elektrode ist die Haut meist gleichmäßig gerötet, je nach der Konzentration des verwandten Stoffes erscheint dann nach einer Latenzzeit von wenigen Sekunden bis zu 2—3 Min. eine leichte oberflächliche Blässe, die rasch an einigen Stellen deutlicher wird. Diese kleinen Flecken, anfangs unscharf, dann immer schärfer begrenzt, rund, mit einem Durchmesser von 2 mm, entstehen zumeist isoliert, meist an den Haarfollikeln, wo sie auch am längsten bestehen bleiben. Es scheint die Haut an diesen Stellen dem elektrophoretischen Eindringen von Ionen den geringsten Widerstand entgegenzusetzen. Auch bei mechanischer Reizung bei Untersuchung der lokalen motorischen Reaktion erweisen sich die Haarfollikel als besonders empfindlich („follikuläre Quaddelbildung", Ebbecke). Auffälligerweise stehen die Flecken immer besonders dicht am Rande des Versuchsfeldes und über den größeren bläulich durchschimmernden Hautvenen. Eine Erklärungsmöglichkeit für die stärkere Randwirkung wäre die Zerrung der Haut, die dort durch das aufliegende Elektrodenglas verursacht wird; für die Bevorzugung der über den Venen gelegenen Hautstellen könnte es das Vorhandensein von kleinsten den Venen parallel laufenden Lymphwegen sein. Bei genügender Konzentration des Mittels nehmen die blassen Flecken dann im Laufe der nächsten Minuten noch an Größe und Intensität zu und verschmelzen teilweise oder vollständig miteinander, so daß eine runde, gleichmäßig intensiv blasse Hautstelle entsteht, die ziemlich scharf begrenzt ist. Bei sehr hohen Konzentrationen kann sie um 1—2 mm über den Druckrand der Flüssigkeitselektrode hinausgehen. Bei Adrenalin und A 40 wird bei stärkeren Konzentrationen als 1:10000 meist auch eine pilomotorische Reaktion beobachtet, die als „Gänsehaut" etwa so lange anhält wie die Blässe.

Nach einer je nach der Konzentration verschieden langen Zeit werden dann die blassen Flecken weniger scharf begrenzt, verschwimmen und machen endlich wieder der normalen Hautfarbe Platz. Es wurde auch bisweilen, besonders nach den größeren Verdünnungen, eine nachträgliche Rötung des Versuchsfeldes beobachtet, die jedoch nie länger anhielt als auch bei Durchströmung mit reiner physiologischer Kochsalzlösung. Wir sahen sie weder als vasodilatatorische Nachwirkung des Adrenalins noch als reaktive Hyperämie (Rein[11], Fischer[12]), sondern als eine nachdauernde Reizwirkung des elektrischen Stromes an. Überhaupt haben wir bei unseren Versuchen eine vasodilatatorische Wirkung des Adrenalins oder seiner Derivate nie mit Sicherheit beobachten können.

Bei Bestimmung der Schwellenkonzentration an der menschlichen Haut konnten wir für Adrenalin die Befunde von Jakobs bestätigen, der eine beginnende schwach abblassende Wirkung bei Versuchspersonen mittleren Alters ziemlich übereinstimmend von Verdünnungen von 1:1 bis 1:4 Million an fand. Mit steigender Konzentration wird die Latenzzeit kürzer, die blassen Flecken werden zahlreicher, konfluieren zum Teil und verschmelzen vollständig von etwa 1:50000 ab.

Die Schwelle für das A 40 liegt bei Verdünnungen von 1:200000 bis 1:800000, völliges Konfluieren ab 1:10000, und die Schwelle für das Aludrin fanden wir bei 1:10000 bis 1:30000. Ein flächenhaftes Konfluieren der Blässe konnten wir mit Aludrin nur gelöst in Aqua dest. ab 1:1000 hervorrufen.

Der zeitliche Verlauf der schwachen Reaktion auf einen eben überschwelligen Reiz ist bei allen drei untersuchten Stoffen gleich. das Maximum der Wirkung wird nach 5—10 Min. erreicht und hält insgesamt für 10—20 Min. an. Danach wird die Abblassung wieder von der normalen Hautfarbe oder der schon erwähnten Nachrötung abgelöst.

Auf eine stärkere Dosis hin, die gerade ausreicht, die Blässe vollständig konfluieren zu lassen, dauert die Reaktion deutlich länger an. Sie erreicht ihr Maximum nach etwa 15—20 Min. und kann bis zu $1^1/_2$ Stunden sichtbar bleiben, beim Adrenalin 1:1000 und A 40 1:200 sogar bis zu 2 Stunden.

Wie die unterschiedlichen Schwellenkonzentrationen vermuten lassen, ist die Stärke der Wirkung der drei miteinander verglichenen Substanzen nicht gleich: das A 40 wirkt etwas schwächer und das Aludrin erheblich schwächer konstriktorisch auf die kleinsten oberflächlichen Hautgefäße als das Adrenalin. Um bei allen dreien eine gleich starke Wirkung zu erzielen, muß bei unseren Versuchen das Aludrin in 2—300fach und das A 40 in 3—5fach stärkerer Konzentration verwandt werden als das Adrenalin. Bei diesen wirkungsgleichen Konzentrationen ist im Ablauf der Vasokonstriktion sonst kein Unterschied festzustellen, Latenzzeit, Wirkungsdauer und Nachwirkung bzw. deren Fehlen sind gleich.

Zum Vergleich und zur Kontrolle der von uns angewandten Methode wurden in einigen Versuchen je 0,1 cm^3 der drei genannten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen in physiologischer Kochsalzlösung intrakutan injiziert. Abgesehen von der etwas größeren Unannehmlichkeit der Applikationsart und der durch den stärkeren Hautreiz lebhafteren Umgebungsröte mit anfänglichem deutlichen Reflexerythem sind Intensität und zeitlicher Verlauf der Abblassungsreaktion genau so, wie wir sie bei den Elektrophoreseversuchen gefunden haben.

Mit den bisher beschriebenen Methoden haben wir eine Wirkung der Adrenalinderivate nach Abklingen der Abblassungsreaktion nicht

mehr feststellen können. Daß trotzdem noch gewisse Mengen dieser Substanz längere Zeit in wirksamer Form in der Haut verbleiben, beweisen folgende Beobachtungen: Durchströmt man eine in der bekannten Weise mit einer höheren Konzentration getestete Hautstelle am folgenden Tage nochmals und verwendet diesmal nur physiologische Kochsalzlösung ohne Zusatz von Pharmaka, so tritt erneut eine deutliche Abblassung auf, die bei einer benachbarten nicht vorbehandelten Kontrollstelle nicht nachzuweisen ist. Diese Abblassung ist nicht anders zu erklären als mit der Annahme einer Speicherung des Pharmakons in wirksamer Form in den oberflächlichen Schichten der Epidermis, das erst bei der erneuten Durchströmung mit in tiefere Hautschichten hereingebracht wird, wo es seine Gefäßwirkung entfalten kann. Diese Depotwirkung ist beim Adrenalin 1:10000 noch nach 72 Stunden und beim Aludrin 1:500 bis zu 48 Stunden nachzuweisen, beim A 40 1:2000 hält sie 24 Stunden an.

Es sei an dieser Stelle noch eine Beobachtung über die Sensibilität der Haut im adrenalinanämischen Bezirk mitgeteilt, die die Reinsche Angabe der gesteigerten Wärmeempfindlichkeit dieses Bezirks[11] ergänzt und die Befunde von H. M. Schneider[13] aus dem Reinschen Institut bestätigt. Wir fanden im Bereich der Abblassung eine deutliche Herabsetzung der Kälteempfindung, die solange wie die Anämie anhält. Berührung mit der Spitze eines Kupferstabes, die für die normale Haut deutlich kalt erscheint, wird hier nur als stumpfe Berührung empfunden. Die Erklärung dafür liegt nahe: Mit der Anämie geht ein Absinken der Hauttemperatur einher, das zu einer Herabsetzung der Kälte- und zu einer Steigerung der Wärmeempfindung führt. Die Berührungs- und Schmerzempfindung wurden bei unseren Versuchen nicht verändert.

Besprechung der Ergebnisse.

1. Es fällt auf, daß die Dauer der Gefäßwirkung des Adrenalins und seiner Derivate bei elektrophoretischer Einbringung in die Haut verhältnismäßig lang ist gegenüber der flüchtigen Blutdruckwirkung bei subkutaner oder gar intravenöser Injektion. Wir dürfen daraus wohl schließen, daß ein Abbau dieser Stoffe nicht in der Haut stattfindet, sondern, wie bekannt, erst im Blut und in der Leber. Eine Bestätigung dieser Annahme gibt uns auch die erwähnte Depotwirkung dieser Stoffe in der Haut. Resorption, Abtransport und damit Unwirksamwerden aber werden durch die lokale vasokonstriktorische Zirkulationsherabsetzung erheblich verzögert. Diese Eigenschaft des Adrenalins nutzen wir ja aus, wenn wir es nicht nur zur Herabsetzung der Blutungsneigung, sondern auch zur Verlängerung der Wirkungsdauer den Lokalanästhetika beigeben.

2. A 40 hat bei nur unwesentlich schwächerer Kapillarverengerung eine erheblich geringere Blutdruckwirkung als das Adrenalin, wie in einer späteren Arbeit zu zeigen sein wird (kleine Dosen senken, erst große Dosen steigern den Blutdruck). Damit könnte es als Ersatz für das Adrenalin bei der Lokalanästhesie geeignet sein, bei der Blutdrucksteigerung und Tachykardie eine unerwünschte und unangenehme Nebenwirkung des Adrenalins sind. Aludrin zeigt eine etwa 10fach stärkere broncholytische Wirkung als Adrenalin (Konzett[3]) bei mehrhundertfach schwächerer Kapillarkonstriktion, was sich als Vorteil bei der therapeutischen Anwendung beim Asthma bronchiale erweist: die Resorptionsverzögerung von der Bronchialschleimhaut bei Inhalation ist entsprechend gering, und der Wirkungseintritt beim akuten Asthmaanfall ist rasch.

3. Bemerkenswert erscheint uns ferner, daß die 3 Substanzen gleichmäßig — wenn auch in verschiedener Intensität — stets eine Kapillarkonstriktion und nie eine Dilatation hervorrufen, obwohl die Wirkung auf den Blutdruck verschieden ist: Aludrin senkt stets, A 40 senkt in kleinen und steigert in hohen Dosen, und Adrenalin erhöht stets den Blutdruck. Es wird damit die eingangs gemachte Bemerkung bestätigt, daß zur genauen Analyse der Kreislaufwirkung eines Pharmakons stets sein Einfluß auf die verschiedenen Kreislaufabschnitte isoliert untersucht werden muß.

4. Es erscheint für die Kapillarkonstriktion ein Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und physiologischer Wirkung der untersuchten Substanzen zu bestehen insofern, als sie mit zunehmender Zahl der C-Atome am Amino-N schwächer wird. A 40 steht dem Adrenalin chemisch am nächsten, es ist lediglich am Amino-N statt des Methylrestes ein Äthylrest angefügt, wobei es unter Wasseraustritt zur Ringbildung gekommen ist, während Aludrin im Isopropylrest zwei zusätzliche C-Atome enthält. Eine ähnliche Feststellung trafen Barger und Dale (zit. nach Konzett[3]), die fanden, daß die pressorische Wirksamkeit der Derivate von p-Hydroxyphenyl-Äthylamin und Brenzkatechin-Äthylamin mit zunehmender C-Atomzahl am Amino-N abnahm.

Zusammenfassung.

Elektrophoretisch in die menschliche Haut eingebrachte Adrenalinderivate Aludrin und A 40 werden auf ihre Gefäßwirkung hin untersucht und mit Adrenalin verglichen. Diese Substanzen wirken auf die Hautkapillaren und die oberflächlichsten kleinen Hautvenen ein und rufen an ihnen eine Vasokonstriktion hervor, die als Hautblässe abzulesen ist. Die Wirkungsschwelle liegt für Adrenalin bei etwa 1:5000000, für A 40 bei 1:800000, und für Aludrin bei 1:10000. Wirkungsgleichheit kann erzielt werden, wenn von A 40 eine 5fach und von Aludrin eine 2—300fach stärkere Konzentration angewendet wird.

Literatur.

[1] Wezler, K., u. R. Thauer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 105 (1943). — [2] Roessler, R.: Wien. klin. Wschr. **1940**, 974. — [3] Konzett, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **197**, 27, 41 (1941). — [4] Groer, F. v.: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 13, Teil 2, H. 1. 1933. — [5] Jakobs, D.: Z. exper. Med. **99**, 195 (1936). — [6] Dalmady, v.: Z. physik. u. diät. Ther. **16**, 513 (1912). — [7] Groer, v., u. Hecht: Biochem. Z. **102** (1919). — [8] Krogh-Ebbecke: Anatomie und Physiologie der Kapillaren. Berlin: Springer 1924. — [9] Spalteholz, W.: Arch. Anat. usw. **1893**, 1. — [10] Ebbecke, U.: Pflügers Arch. **195**, 300 (1922). — [11] Frey, M. v., u. H. Rein: Physiologie der Haut. Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Bd. 1, Teil 2, S. 1—160. Berlin 1929. — [12] Fischer, L.: Z. Biol. **86**, 351 (1927). — [13] Schneider, H. H.: Pflügers Arch. **249**, 583 (1948).

Dr. R. Kadatz, Bonn, Physiologisches Institut.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 372—379 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.

Über die Cholinesterase des Froschherzens.

VI. Mitteilung.

Zum Wirkungsmechanismus cholinergischer Stoffe.

Von

Margot Lorenz und Fritz Jung.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Januar 1949.)

Wir haben am Froschherzen als einem möglichst einfachen Objekt die Aktivität einer organeigenen Cholinetterase in situ zu bestimmen versucht. Dies ist auf dem naheliegenden Weg eines Vergleiches zwischen der Acetylcholinwirkung vor und nach Physostigminbehandlung nicht möglich (vgl. folgende Mitteilung) sondern muß durch laufende Verfolgung der Spaltung einer bestimmten, in ein schlagendes Herz eingebrachten, Menge Acetylcholin geschehen. Der Spaltungsvorgang durch die an die Herzwand gebundene Esterase ist eine heterogene Katalyse, deren Gesetzmäßigkeiten im einzelnen wohl rechnerisch nicht einfach zu erfassen sind. Veranlassung für unsere Studie war nicht nur die jüngst auch von Schäfer[1] nachdrücklich betonte Notwendigkeit eines eingehenderen Studiums der organeigenen Cholinesterasen, sondern insbesondere das Bedürfnis, die Analyse der Acetylcholinwirkung an einem einfachen Organ durch eine quantitative Erfassung der beteiligten Faktoren weiter zu treiben. Insofern schließt sich auch diese Studie an frühere Mitteilungen aus dem Berliner Institut[2] an, in welchen experimentelle und theoretische Bedenken gegen die besonders in pharmakologisch-klinischen Vorstellungen immer noch wirksame Potentialgifttheorie der cholinergischen Wirkung geäußert wurden.

Methodik.

Die Versuche wurden in den Monaten September 1947 bis Februar 1948 an Herzen von *Rana temporaria* aus der Würzburger Umgebung durchgeführt. Je ein elektrisch (durch 30 Kondensatorentladungen je Minute) gereiztes Ventrikelpräparat diente als Versuchsobjekt und für die notwendigen Acetylcholinbestimmungen. Allerdings wurde als „Testherz" immer ein möglichst empfindliches Präparat ausgewählt. Als Nährlösung diente eine von v. Muralt angegebene Phosphat-gepufferte Ringerlösung, welcher noch 50 mg-% Glukose zugesetzt wurden. Kanüle und Herz wurden jeweils mit einer bekannten Menge einer 10^{-7} oder 10^{-8} g/cm^3 enthaltenden Acetylcholinlösung gefüllt, diese nach 15, 30 oder 60 min wieder entnommen und am Testherzen mit einer entsprechend verdünnten

Ausgangslösung verglichen. Die meisten Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Bei den Temperaturversuchen konnte das Froschherz in einer feuchten Kammer suspendiert werden, deren doppelte Wände von einem Thermostaten aus mit Wasser verschiedener Temperatur durchströmt wurden. — In einigen Versuchen wurden Herzen, deren Spaltungsaktivität in einem Vorversuch bestimmt worden war, mit ein paar Körnchen Quarzsand und 3 cm^3 physiologischer Lösung zerrieben. Nach Abzentrifugieren der Gewebsreste wurde 1 cm^3 Acetylcholinlösung 10^{-6} g/cm^3 zugegeben und auf 10 cm^3 aufgefüllt. Davon wurde 1 cm^3 sofort mit 9 cm^3 eserinhaltiger Tyrode gemischt, der Rest kam in ein Wasserbad von 25°, und es wurden in Abständen von 15, 30 und 60 min weitere Proben entnommen. Nach Abschluß des Versuches wurden die Acetylcholingehalte der einzelnen Proben an einem Testherzen bestimmt. In eben dieser Weise wurden auch einige Versuche ohne Abzentrifugieren des Muskelbreies durchgeführt. — Als Substanzen wurden verwandt: Acetylcholinchlorid und Physostigminsalizylat der Firma Hoffmann-La Roche und Carbaminoylcholin als Doryl-Merck.

I. Spaltungsversuche bei Zimmertemperatur.

a) Das Ergebnis einer größeren Anzahl von Versuchen ist in Abb. 1a und b wiedergegeben. Die Punkte sind die Ergebnisse von Einzelversuchen. Soweit diese an demselben Herzen erhalten wurden, sind sie durch feine Linien verbunden; es handelt sich aber um unabhängige Bestimmungen und nicht um verschiedene Proben aus derselben Herzfüllung. Für die 3 Entnahmezeiten sind die Mittelwerte sämtlicher Versuche durch Kreuze dargestellt und durch starke Linien verbunden. Weniger aus dem Einzelverlauf der beiden Mittelwertskurven als aus der Tatsache, daß die beiden Versuchsreihen trotz einer um den Faktor 10 verschiedenen Acetylcholinkonzentration etwa die gleiche *relative* Abbaugeschwindigkeit ergeben, folgt ein Abbau des Acetylcholins im Herzinhalt nach einem einfachen logarithmischen Gesetz: *Die Abbaugeschwindigkeit ist proportional der Acetylcholinkonzentration.*

Unterstellt man diese Beziehung, so kann man die gesamten Einzelbestimmungen miteinander vergleichen. Dazu wird in einem halblogarithmischen Netz (Log [Acetylcholinkonzentration] gegen Zeiteinheit) durch lineare Inter- oder Extrapolation jeder Meßwert auf dieselbe Zeit (am bequemsten auf 30 min) bezogen und mit diesen neuen Werten (als Maßzahlen der einzelnen Abbaugeschwindigkeiten) Mittel und Streuung sämtlicher Versuche berechnet. Für die beiden verwandten Acetylcholinkonzentrationen von 10^{-7} und 10^{-8} g/cm^3 (18 bzw. 26 Versuche) werden dabei für den Zeitpunkt 30 min die Werte log (Acetylcholinkonzentration) = 0,67 und 0,63 erhalten, falls der log der Ausgangskonzentration willkürlich 1,0 gesetzt wird. Die zugehörigen mittleren Abweichungen betragen $\sigma = 0{,}15$ und 0,17. Der Unterschied zwischen beiden Mittelwerten ist nicht signifikant. Faßt man beide zu 0,65 zusammen und geht von den Logarithmen auf Prozentwerte über, so heißt dies Ergebnis, daß nach 30 min Aufenthalt im Froschherzen + Kanüle noch 45% des Acetylcholins nachweisbar sind.

(Dieses Mittel weicht als geometrisches Mittel geringfügig von dem aus Abb. 1a und b leicht zu gewinnenden arithmetischen Mittel ab.)

Aus dem Mittelwert für 30 min läßt sich für das Zerfallsgesetz $Ac_t = Ac_0 \cdot e^{-kt}$ (Ac_0 ist Anfangs- und Ac_t Endkonzentration des Acetylcholins nach einer Versuchszeit t) die Konstante $k = 4{,}5\ 10^{-4}$/sec und eine Halbwertszeit von ungefähr 25 min errechnen. Die je Herzrevolution zerstörte Acetylcholinmenge ergibt sich bei der kurzen Periodendauer von 2 sec und der Kleinheit von k aus der Näherungsformel

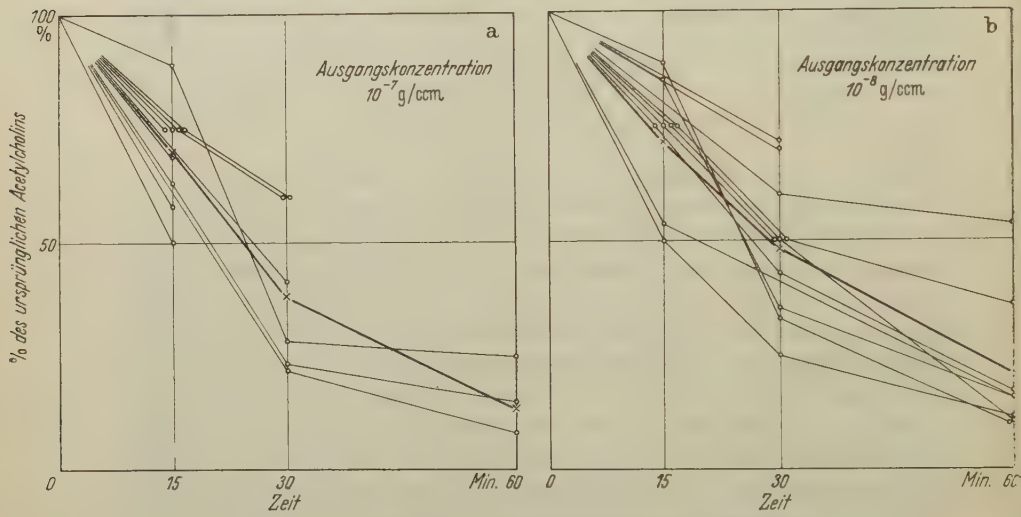


Abb 1a u. b. Abbau des Acetylcholins durch ein Froschherz.
—o—o— Einzelbestimmungen; —x—x— Mittelwerte.

$Ac_t = Ac_0 \cdot (1^{-kt})$ zu etwa 0,1%. Die jeweils in Herz + Kanüle gegebene Flüssigkeitsmenge beträgt 1 cm³. Von dieser Lösung gelangt aber je Diastole nur ein dem Schlagvolumen entsprechender Teil ins Herzinnere. Durch Kalibrierung der Kanüle und Ablesung des Flüssigkeitsspiegels in der Systole und Diastole haben wir das Schlagvolumen bei einer größeren Zahl von Herzen im Durchschnitt zu 100 mm³ ermittelt. Je Diastole ist somit $^1/_{10}$ des Kanüleninhalts ins Herz gekommen. Je Herzrevolution wird daher etwa 1% des im Herzinneren enthaltenen Acetylcholins gespalten.

b) Neun Herzen wurden auf Extrakt verarbeitet. Dieser war bei 5 Herzen praktisch ohne Esterasewirkung, bei 2 Herzen zeigte er eine geringe, mit der Aktivität unzerstörter Herzen nicht vergleichbare Wirkung. Weitere 2 Extrakte zeigten innerhalb der ersten 15 min Spaltungswerte, welche mit denen unzerstörter Herzen vergleichbar waren. Doch bauten auch diese Extrakte in den folgenden 30 und 60 min nicht weiter ab. Der Versuch bestätigte somit die bekannte Tatsache,

daß sich die Organesterase durch eine einfache mechanische Zerstörung und folgende Elution nicht abtrennen läßt.

Aus 7 Herzen wurde Muskelbrei hergestellt und dessen Aktivität bestimmt. Davon spaltete ein einziges Herz innerhalb der ersten Viertelstunde nicht, nach 60 min waren aber erhebliche Spaltungswerte aufgetreten. Alle anderen waren aktiv, und zwar bewegten sich ihre Spaltungswerte nach 15 und 30 min innerhalb des $3\,\sigma$-Bereiches der unzerstörten Organe. Der Mittelwert des restlichen Acetylcholins betrug nach 30 min zufällig eben 45%, also soviel wie bei unzerstörten Herzen.

Unsere Versuchsbedingungen gestatten einen Vergleich der beiden Versuchsreihen unter a) und b): Die Herzreste waren in 10 cm³ Acetylcholinlösung aufgeschwemmt, es war somit je Kubikzentimeter Lösung eine 10mal kleinere Fermentmenge vorhanden als beim Spaltungsversuch an der Kanüle. Dafür aber hatten die Teilchen die Möglichkeit mit dem gesamten freien Acetylcholin zu reagieren und nicht nur mit $^1/_{10}$ des Ansatzes. Damit werden die Wirkungsbedingungen annähernd vergleichbar, wenn auch die quantitative Übereinstimmung zufällig sein dürfte.

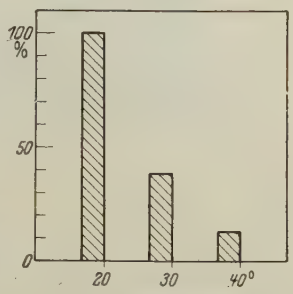


Abb. 2. Abhängigkeit der Acetylcholinwirkung von der Temperatur (Prozent der Wirkung bei 20°).

Das Ergebnis dieser zweiten Versuchsreihe ist demnach, daß eine grobe Strukturzerstörung des Herzens keine wesentliche Aktivitätsänderung der Esterase herbeiführt. Indirekt könnte man hieraus auch schließen, daß am tätigen Herzen die ganze anwesende Esterase wirksam ist, da bei Zerstörung der Zellen kein weiteres Ferment wirksam wird.

II. Temperaturabhängigkeiten.

Abb. 2 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Acetylcholin*wirkung* am Froschherzen, welche wir als Nebenbefund unserer Versuche erhalten haben. Die Daten sind aus 29 Versuchen zusammengestellt, in welchen je 2 oder 3 verschiedene Temperaturen geprüft wurden. Die Temperaturabhängigkeit entspricht größenordnungsmäßig den von Laubender[3], an anderen Organen allerdings, für den Temperaturbereich unter 20° gefundenen Werten. Da das vorliegende Reaktionssystem sehr verwickelt sein dürfte, möchten wir im Gegensatz zu Laubender aus unseren Werten keine thermodynamischen Größen ableiten. Auch auf sonstige Wirkungen der Temperatursteigerung am Froschherzen soll hier nicht eingegangen werden.

Unsere Spaltungsversuche gaben nur bei Anwendung der *höheren* Acetylcholinkonzentration von 10^{-7} g/cm³ ein übersichtliches Ergebnis, welches in Abb. 3 wiedergegeben ist. Die Aktivität des Fermentes nahm in jedem Versuch zwischen 20 und 30° im Mittel auf etwa das Doppelte

zu. Zwischen 30 und 40° trat nur bei einem Teil der Herzen eine weitere Wirkungssteigerung auf, bei dem Rest verminderte sich die Aktivität wieder und in einem Falle war überhaupt keine Spaltung mehr nachweisbar. Um die Natur dieser Wirkungsabnahme zu untersuchen, wurde bei einer Reihe von Herzen der Versuch ein zweites Mal wiederholt, wobei sich zeigte, daß das Ferment ganz oder teilweise zerstört worden war (Abb. 4). Eine solche *vollständige* Inaktivierung des Fermentes gelang nur bei einem Teil der Herzen vor Eintritt von Schlagfolgestörungen oder Wärmekontraktur. Eine partielle Inaktivierung war immer nachweisbar. Wie ferner aus Abb. 3 hervorgeht, waren die einzelnen Herzen sehr verschieden temperaturempfindlich. Von 8 geprüften Herzen zeigten 5 bei 40° bereits in der ersten Testung eine verminderte Aktivität (punktierte Linien der Abb. 3).

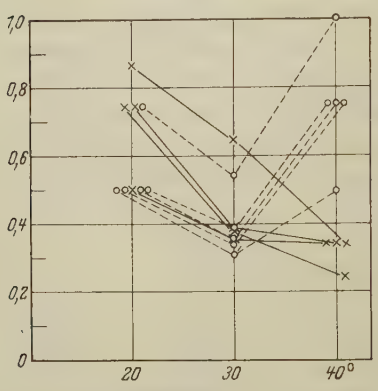


Abb. 3. Abhängigkeit der Acetylcholinspaltung von der Temperatur. Ausgangskonzentration 10^{-7} g/cm³. Ordinate: Nach 15 min im Froschherz noch erhaltener Bruchteil.

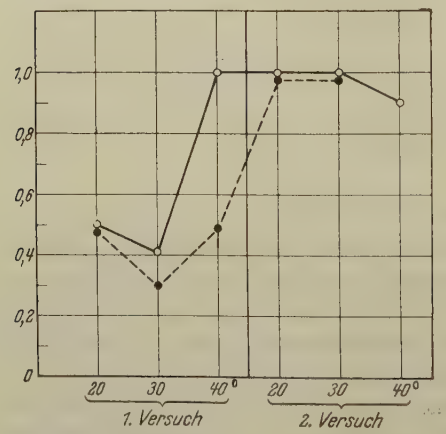


Abb. 4. Abhängigkeit der Acetylcholinspaltung von der Temperatur (vgl. Abb. 3). Wiederholung des Versuches an demselben Herz: Zerstörung des Ferments.
——— 10^{-8} g/cm³ Acetylcholin;
- - - - - 10^{-7} g/cm³ Acetylcholin.

Unsere Versuche mit der *geringeren* Acetylcholinkonzentration von 10^{-8} g/cm³ ergaben wesentlich umfangreichere Inaktivierungserscheinungen. Bereits 4 von 12 geprüften Herzen zeigten bei 30° eine verminderte Spaltungsaktivität und bei 40° spaltete nur noch ein Herz schneller als bei 30°. Aus diesem Grund wurde auch auf eine Darstellung im Diagramm verzichtet. Temperaturen über 30° inaktivieren somit die Cholinesterase des Froschherzens, und zwar meist irreversibel. Die Anwesenheit einer höheren Acetylcholinkonzentration könnte möglicherweise einen gewissen Schutz für das Ferment darstellen. Für eine Bestimmung von Reaktionswärmen dürften unsere Daten ungeeignet sein, da wir nicht wissen, wie weit unsere bei 30° beobachteten Spaltungswerte sich noch auf unverändertes oder bereits partiell geschädigtes Ferment beziehen.

Bei Durchführung der Spaltungsversuche an den wieder abgekühlten Herzen zeigte sich nun ein sehr überraschendes Verhalten gegenüber Acetylcholin. Mit der Zerstörung des Fermentes war auch das Reaktionsvermögen gegenüber Acetylcholin verloren gegangen. Zu diesem Befund wird in Abb. 5 eine Originalkurve wiedergegeben.

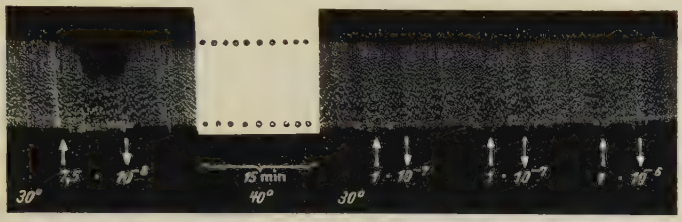


Abb. 5. Zerstörung der Acetylcholinempfindlichkeit durch Erwärmen. Acetylcholinkonzentration in g/cm³.

III. Kontrollbeobachtungen.

Da Carbaminoylcholin von Cholinesterase kaum gespalten wird, haben wir einige Kontrollversuche mit Doryl-Merck angeschlossen, um festzustellen, ob die von uns beobachteten Spaltungswerte reine Esteraseeffekte sind und ob nicht Ad- oder Absorptionserscheinungen Spaltungen vortäuschen. Eine eindeutige Spaltung wurde niemals gesehen. In 7 Versuchen mit einer Einwirkungsdauer von 60 min wurde durchschnittlich ein Abbau von nicht ganz 10% erhalten. Allerdings mußten wir bei wiederholter Prüfung der Spaltungsfähigkeit einige Male feststellen, daß bei der ersten Messung ein Dorylschwund geringeren Umfanges nachweisbar war. So zeigte ein Herz im ersten Versuch (15 min Dauer) einen Abbau auf 86%, im dritten Versuch (60 min Dauer), dagegen überhaupt keinen Abbau. Mit einem Schwund der wirksamen Substanz auf andere Weise muß somit in geringem Umfang gerechnet werden.

Wir haben ferner bei allen Versuchen nicht nur den Schwund an Acetylcholin oder Carbaminoylcholin in der Herzinnerenflüssigkeit verfolgt, sondern jeweils diesen mit der Wirkungsabnahme am Herzen selbst verglichen. Es ließ sich dabei feststellen, daß die Konzentrationsabnahme im Herzinnern bei längerer Acetylcholinwirkung keineswegs die einzige Ursache für Wirkungsveränderungen ist. Es wurden teilweise — allerdings seltener — Sensibilisierungserscheinungen, teilweise auch Wirkungsabnahmen beobachtet, welche weit über das aus dem Acetylcholinschwund zu erwartende Maß hinausgingen.

IV. Besprechung.

Das im I. Abschnitt empirisch gewonnene Zerfallsgesetz läßt sich auch mathematisch ableiten. Nimmt man an, daß a das Gesamtvolumen

des Ansatzes sei, so ist die zu Versuchsbeginn vorhandene Acetylcholinmenge $a\ Ac_0$ und die bei einem Herzvolumen b im Herzen vorhandene Menge $b\ Ac_0$. Von der letzteren werden je Kontraktion der Bruchteil α, also insgesamt die Menge $\alpha\ b\ Ac_0$ gespalten. Es herrscht dann nach der 1. Kontraktion die Konzentration $Ac_1 = Ac_0 \left(1 - \frac{\alpha b}{a}\right)^1$ und nach der n-ten Kontraktion entsprechend $Ac_0 = Ac_0 \left(1 - \frac{\alpha b}{a}\right) n$.

Dies ist das eigentliche Zerfallsgesetz, aus welchem das oben verwandte logarithmische Gesetz $Ac_t = Ac_0 \cdot e^{kt}$ hervorgeht, wenn der je Kontraktion gespaltene Bruchteil des Acetylcholins $\alpha b/a$ klein ist. Für den von uns festgestellten Wert von 0,1% trifft dies zu. Für unsere künstliche Versuchsanordnung folgt übrigens, daß die Spaltungsgeschwindigkeit von der Herzfrequenz abhängig ist. Eine Prüfung dieser Abhängigkeit haben wir unterlassen, da von ihr keine neuen wesentlichen Daten zu erwarten waren. Die Größe α wurde oben bereits zu 1% festgestellt; aus den oben angegebenen Daten läßt sich ferner ermitteln, daß die Halbwertszeit des Acetylcholins im Herzinnern etwa $2^1/_2$ min. und die Spaltungskonstante $k = 4{,}5\ 10^{-3}$/sec sein muß. Für die Beurteilung der Aktivität der Organcholinesterase wird aber noch zu berücksichtigen sein, daß das Schlagvolumen nicht die ganze Herzrevolution in Kontakt mit dem Herzen ist, sondern nur während der Diastole. Die Spaltung dürfte also noch etwas schneller sein. Trotz dieser Korrekturen ergeben sich auffallend geringe Spaltungszeiten durch das Herz selbst, was wohl für die physiologische Funktion nicht ohne Bedeutung ist. Die Flüchtigkeit der physiologischen Acetylcholinwirkung, also etwa einer Vagusreizung, darf keineswegs in der üblichen Weise einfach auf die Spaltung des Wirkstoffes bezogen werden, sondern wird zu einem wesentlichen Anteil auf Verdünnungs- und Abdiffusionseffekte zurückzuführen sein.

Entsprechende Versuche aus der Literatur sind zunächst die klassischen Studien von Loewi und Navratil[4]. Soweit sich aus deren Versuchsbeispielen Zahlenangaben entnehmen lassen, besaß die Esterase ihrer Herzen eine nicht unerheblich größere Aktivität. Sie stellten z. B. an einem Eskulentenherzen fest, daß bei einem Kanüleninhalt von $^1/_2$ cm³ bereits nach 3—5 min alles Acetylcholin verschwunden war. Dementsprechend haben bei ihnen auch Herzextrakte eine etwas größere Wirkung als bei uns. Allerdings arbeiteten sie mit Eskulenten, bei welchen die Verhältnisse vielleicht quantitativ anders liegen als bei Temporarien.

Am Coronargefäßsystem des isolierten Kaninchenherzens haben ferner Genuit und Labenz[6] eine eingehende Analyse der Acetylcholinspaltung durchgeführt. Es ist bemerkenswert, daß deren Ergebnisse an einem doch andersartigen Objekt mit den unseren praktisch über-

einstimmen. So verdoppelt eine Temperatursteigerung um 10° auch bei ihnen die Spaltungsgeschwindigkeit und die Halbwertszeit des vorgelegten Acetylcholins ergibt sich unabhängig von der Konzentration zu etwa 3 min. Schon daraus kann wiederum geschlossen werden, daß die Flüchtigkeit der Acetylcholinwirkung nichts mit der Spaltung des Wirkstoffs zu tun hat, sondern andere Effekte zugrunde liegen. Wir haben dies inzwischen im Blutdruckversuch am Kaninchen und der Katze auch sehr wahrscheinlich machen können (Schoetensack und Jung unveröffentlicht), die flüchtige Wirkung einer Einzelgabe beruht auf der fast augenblicklichen Reversibilität der Acetylcholinwirkung nach Entfernung der Substanz und der schnellen Verdünnung im Gesamtblut im Verzug eines Blutumlaufs. Die Esterase hat dagegen die Akkumulation laufend frei werdenden Wirkstoffs im Blut zu verhindern.

Die von uns beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Acetylcholinspaltung entspricht den Angaben von anderer Seite an verschiedenen Esterasezubereitungen. Sie ist vor allem bei Beurteilung von Literaturstellen von Bedeutung, in welchen „Esteraseaktivitäten" von Organen lediglich mittels gespaltenen *absoluten* Acetylcholinmengen beurteilt, dagegen nicht die angewandten Konzentrationen genannt werden (vgl. Guggenheim[5]).

Zusammenfassung.

1. Die Fähigkeit des Herzventrikels von Rana temporaria zur Acetylcholinspaltung wird quantitativ bestimmt. Die Spaltungsgeschwindigkeit ist proportional der Acetylcholinkonzentration. Je Kontraktion wird etwa 1% des im Herzinnern enthaltenen Acetylcholins zerstört.

2. Die Spaltung ist temperaturabhängig. Sie verläuft bei 30° etwa doppelt so schnell wie bei 20°, jedoch tritt bei Temperaturen zwischen 30 und 40° bereits irreversible Zerstörung des Fermentes auf.

3. Durch Erwärmung auf 40° läßt sich bei manchen Herzen nicht nur die Esterase inaktivieren, sondern auch die Ansprechbarkeit auf Acetylcholin aufheben.

Literatur.

[1] Schäfer, H.: Pflügers Arch. **249**, 405 (1948). — [2] Asen, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 67 (1947). — [3] Laubender, W., u. H. Kolb: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 401 (1936). — [4] Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 689 (1926). — [5] Guggenheim, M.: Die biogenen Amine. Basel: S. Karger 1940. — [6] Genuit, H., u. K. Lorenz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **198**, 369 (1941).

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 380—387 (1949).

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. Letterer).

Studien zum Cholesterinstoffwechsel der Maus.

III. Mitteilung.

Untersuchungen über Cholesterinmast.

Von

Gotthart Schettler*.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Januar 1949.)

In Fütterungsversuchen mit Cholesterin (Chol.) kommt dem Grundfutter eine entscheidende Bedeutung zu. Der Gehalt der Basaldiät an Fetten und Lipoiden, Eiweiß, Kohlenhydraten, Vitaminen, Salzen, Schlacken und der kalorische Wert scheinen hierbei ausschlaggebend zu sein. In Mitteilung I und II wurde der Einfluß verschiedener Fette und Lipoide auf den Blutcholesterinspiegel der Maus untersucht. Zweck der folgenden Arbeit ist es, die Wirkung weiterer Bestandteile des Grundfutters auf Blutchol. und Chol.-Mast zu untersuchen.

Methodik.

Etwa 15—20 g schwere Mäuse gleicher Zucht erhielten täglich etwa 5 g der geprüften Diät mit und ohne Zusatz von 20 mg Chol. pro die. Nach dreiwöchiger Fütterung wurden sie durch Halsschnitt getötet und ausgeblutet. Die Bestimmungen von gesamtem, freiem und verestertem Chol. erfolgten nach Schönheimer und Sperry in eigener Modifikation [s. (1)] an Blut und feuchtem Frischorgan. Berechnung des mittleren Fehlers nach Koller[3]. Im einzelnen setzen sich die Diäten wie folgt zusammen.

1. Mischfutter nach Vogt-Moeller: Weizen 60%, Kasein 18%, Vollmilchpulver 12,5%, Butterfett 7%, Salzgemisch 2,5%; an Stelle von Butterfett verwandte ich Depotfett vom Hund, als Salzgemisch die Osbornsche Salzmischung[5]. Der kalorische Gehalt dieser Futterart wurde mit 437,9 Kal. auf 100 g Futter berechnet. Dieses Vogt-Moeller-Futter wird von den Mäusen sehr gern genommen und gut vertragen. Von 10 in den Versuch genommenen Tieren nahmen alle 10 um rund 12% zu. Nach dreiwöchentlicher Fütterung wurden sie getötet, Leber, Milz, Nieren und Blut analysiert. Die Fettdepots waren gut ausgebildet. An den Organen waren keine Besonderheiten, insbesondere makroskopisch keine Fettlebern festzustellen.

2. Mischfutter nach Letterer. Getrocknete menschliche Plazenta 12,8%, Mais 32,2%, Roggen 30%, Hafer 20%, Hefe 2%, Osborn-Salzmischung 3%. Die Körner wurden geschrotet und mit der blutfrei gepreßten, im Wolf zerkleinerten Plazenta und den übrigen Bestandteilen gemischt. Der kalorische Wert dieses Futters beträgt 290, 1 Kal. je 100 g Futter.

* Schettler, Gotthart: Biochem. Z. (I. Mitt.) **319**, 349 (1949). — Klin. Wschr. (II. Mitt.) **1948**, 566.

Zunächst wurden vorher auf Haferkost gesetzte Tiere an die neue Kost gewöhnt und dann 3 Wochen mit diesem Futter ernährt. Die Tiere vertragen das Futter ganz vorzüglich, sehen gut aus und nehmen durchweg an Gewicht zu. Es wurden 10 Tiere eingesetzt und analysiert. Autoptisch boten sie keine Besonderheiten. Keine Fettlebern.

3. Mischfutter nach JAFFÉ (etwas abgewandelt). Weizenmehl 14,8%, Vollmilchpulver 74,1%, Fett 11,1%. An Stelle des von JAFFÉ angegebenen Schweine- und Butterfettes wurde Depotfett verwandt. 100 g Futter liefern 517,9 Kal.

Die Tiere nehmen es gern, sie sind lebhaft und nehmen an Gewicht zu. Vereinzelt kommt es zu Leberverfettungen.

Zum Vergleich wurden ferner Tiere mit gemahlenem Hafer gefüttert, dem zur besseren Resorption zugesetzten Chol. 10% Depotfett beigemischt wurde.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick des nach dem kalorischen Wert berechneten Nährstoffgehaltes dieser Futtergemische.

Tabelle 1.

	Eiweiß	Fett	Kohlenhydrate	Kalorienwert je 100 g
VOGT-MOELLER-Futter	*32,3*	23,2	44,5	437,9
LETTERER-Futter	15,0	11,5	*73,5*	290,1
JAFFÉ-Futter	15,4	*51,1*	35,5	517,9
Hafer + 10% Depotfett . . .	10,1	34,6	55,3	390,0
LETTERER-Futter + 10% Depotfett	10,9	35,7	53,4	354,1

Es wurden also außer Hafer gefüttert:

Eine eiweißreiche (VOGT-MOELLER-), eine fettreiche (JAFFÉ-) und eine kohlenhydratreiche (LETTERER-)Kost. Die beiden letztgenannten Diäten haben annähernd den gleichen Eiweißgehalt, das VOGT-MOELLER-Futter die ausgeglichenste Verteilung der Nährstoffe.

Das Eiweiß ist bei allen Futterarten vorwiegend tierischer Herkunft (Milchpulver, Plazenta, Kasein), das pflanzliche entstammt Zerealien. Das Fett ist außer den Fetten der Getreidearten (Hafer, Mais) Depotfett vom Hund. Dazu kommen Milch- und Plazentafett.

Ergebnisse.*

Für Blut und Organe ergibt sich dabei folgendes:

1. *Blut.* Die Blutwerte der ohne Chol.-Zusatz gefütterten Tiere entsprechen für VOGT-MOELLER (VM)-Tiere und JAFFÉ (J)-Tiere den nach Haferfütterung gewonnenen. Das ist verwunderlich, denn diese Futtergemische enthalten Depotfett, in dem etwas Chol. vorhanden ist, und dessen Beifütterung zu Hafer einen deutlichen Anstieg des freien und veresterten Chol. hervorrief (s. Mitt. I). Die VM-Tiere nahmen täglich mit dem Depotfett nicht unter 0,5 mg Chol. in 0,35 g Fett auf, die J-Tiere nicht unter 0,8 mg in 0,56 g Fett. Dazu kommt noch der Chol.-Gehalt des Vollmilchpulvers.

Der Chol.-Gehalt des verwandten Depotfettes, einer Mischung aus Fetten verschiedener Hunde, wurde anfangs mit einer Methodik bestimmt, die sich später als unzureichend erwies. Infolgedessen kann er nicht mit Bestimmtheit

* Alle Zahlen bedeuten Cholesterin in mg-%, bezogen auf Frischgewicht.

Tabelle 2. *Fütterung ohne Chol.-Zusatz (3 Wochen).*

		Blut	Leber	Milz	Niere
1. Hafer (20 Tiere).					
Gesamtes Cholesterin .		100,3 ± 13,5	391,4 ± 71,4	221,1 ± 32,4	330,2 ± 21,9
Freies Cholesterin . . .		75,2 ± 6,3	342,2 ± 53,1	210,6 ± 30,3	303,1 ± 19,5
Verestertes Cholesterin.		25,1 ± 7,1	49,2 ± 28,8	10,5 ± 4,5	27,1 ± 6,8
2. VOGT-MOELLER-Futter (10 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	93,1 ± 3,1	374,3 ± 26,0	266,0 ± 21,6	332,9 ± 19,5
	frei	64,5 ± 4,1	305,7 ± 20,5	252,9 ± 22,8	299,1 ± 14,1
	verestert	28,6 ± 2,1	68,6 ± 11,5	13,1 ± 4,7	33,8 ± 18,0
3. LETTERER-Futter (10 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	173,3 ± 17,7	369,0 ± 25,3	289,0 ± 8,3	313,6 ± 18,7
	frei	91,3 ± 4,5	287,3 ± 21,3	265,5 ± 14,2	—
	verestert	82,0 ± 14,2	81,7 ± 15,1	23,5 ± 6,1	—
4. JAFFÉ-Futter (10 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	98,2 ± 2,8	363,8 ± 34,2	282,9 ± 20,9	319,4 ± 9,8
	frei	71,4 ± 3,6	322,8 ± 31,4	272,6 ± 19,8	296,7 ± 8,7
	verestert	26,8 ± 2,7	41,0 ± 12,4	10,3 ± 4,4	22,7 ± 5,5

angegeben werden. Nach dem von KRUCKENBERG[4] ausgearbeiteten Verfahren enthält Depotfett Gesamtchol. in Höhe von 140—200 mg-%. Unseren noch mit der alten Methode angestellten, als unzulänglich erkannten Bestimmungen, wurde ein Schätzungswert von 160 mg-% zugrunde gelegt.

Die LETTERER (L)-Tiere hingegen zeigen ohne zusätzliche Chol.-Gaben einen deutlichen Anstieg des veresterten, weniger stark des freien Chol. im Blut. Dieser Anstieg geht vermutlich auf Konto des hohen Chol.-Gehaltes dieser Futterart. Je Tier wurden täglich rund 5,7 mg Chol. in 5 g Futter aufgenommen, das ausschließlich in der Plazenta vorhanden ist, so daß also hier eigentlich schon eine

Tabelle 3. *Fütterung mit zusätzlich 20 mg Chol. täglich (3 Wochen).*

		Blut	Leber	Milz	Niere
1. Hafer + 0,5 g Depotfett (16 Tiere).					
Gesamtes Cholesterin.		211,6 ± 29,1	680,1 ± 42,6	646,4 ± 117,6	509,5 ± 45,0
Freies Cholesterin . . .		122,6 ± 68,1	336,1 ± 36,6	401,0 ± 77,4	337,2 ± 31,2
Verestertes Cholesterin .		89,0 ± 11,4	344,0 ± 36,6	245,4 ± 54,9	172,3 ± 32,7
2. VOGT-MOELLER-Futter (18 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	145,7 ± 9,6	576,4 ± 47,1	350,3 ± 65,0	377 5 ± 30,7
	frei	83,8 ± 3,0	424,2 ± 32,2	253,7 ± 29,9	275,3 ± 11,7
	verestert	61,9 ± 7,5	152,2 ± 28,6	96,6 ± 82,0	102,2 ± 40,2
3. LETTERER-Futter 0,5 g Depotfett (18 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	164,0 ± 5,9	522,3 ± 24,5	296,5 ± 31,1	350,5 ± 18,0
	frei	109,0 ± 5,9	287,1 ± 25,8	264,6 ± 18,1	300,3 ± 17,6
	verestert	55,0 ± 5,1	235,2 ± 27,8	31,9 ± 9,3	50,2 ± 8,6
4. JAFFÉ-Futter (16 Tiere).					
Cholesterin	gesamt	174,3 ± 17,8	404,7 ± 45,7	461,6 ± 157,8	432,2 ± 48,6
	frei	98,5 ± 11,2	224,8 ± 22,5	269,5 ± 23,6	374,5 ± 75,8
	verestert	75,8 ± 14,6	179,9 ± 32,6	192,1 ± 147,5	57,7 ± 29,0

Art Chol.-Fütterung vorliegt. Zur Klärung weiterer Differenzen, wie sie im Organgehalt auftreten, dient der Chol.-Gehalt des Futters jedoch nicht (s. unten).

Zusatz von 20 mg Chol. läßt freies und verestertes Chol. bei VM- und J-Tieren ansteigen. Die L-Tiere lassen auffallenderweise nach Chol.-Zusatz keine Chol.-

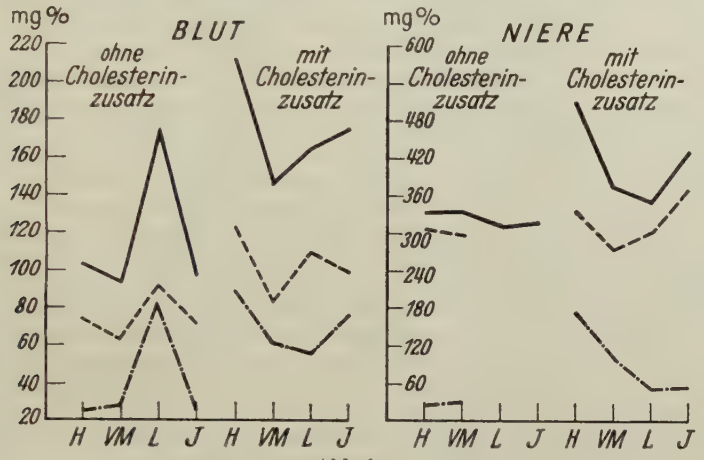


Abb. 1.

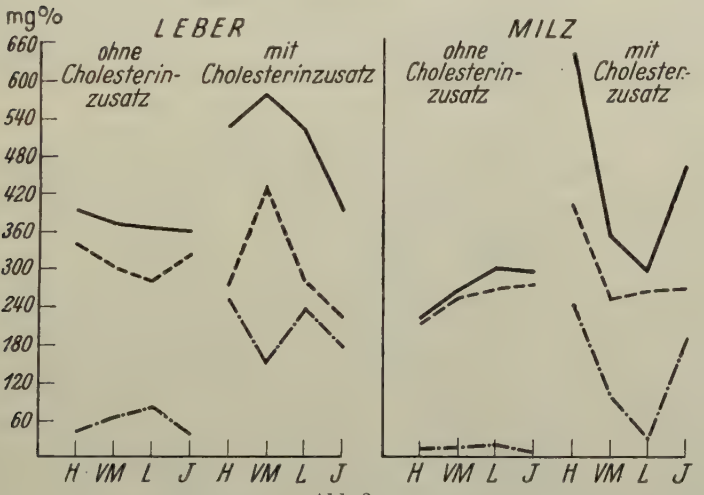


Abb. 2.

Abb. 1 u. 2. Mittlere Cholesterinwerte in mg-% bei Verwendung von Hafer-(H), Vogt-Moeller-(VM), Letterer-(L), und Jaffé-(J)Diät.
——— gesamtes; — — — freies; — · — · — verestertes Cholesterin.

Zunahme erkennen, obwohl zur Verbesserung der Chol.-Resorption täglich 0,5 g Depotfett beigegeben wurden. Die Werte für das veresterte Chol. liegen nach Zusatz von 20 mg Chol sogar niedriger. Die entsprechenden Werte der mit Hafer und Depotfett und Chol. gefütterten Tiere werden von den VM-, J- und L-Tieren nicht erreicht.

2. *Leber.* Ohne Chol.-Zusatz haben VM-, J- und L-Tiere Chol.-Gehaltszahlen in der Leber, die den Hafertieren in allen 3 Fraktionen entsprechen. Zusatz von 20 mg Chol. zu VM-Futter läßt freies und verestertes Chol. ansteigen. Bei den J-Tieren kommt es dagegen zu keinem sicheren Anstieg des Gesamtchol., aber zu Verschiebungen zwischen freiem und verestertem Chol. Die *Ester* der Leber nehmen *auf Kosten* des *freien* Chol, *bedeutend zu.* Diese Zunahme gilt auch für die L-Tiere nach Zusatz von 0,5 g Depotfett und 20 mg Chol. täglich.

3. *Milz.* Auch in der Milz ist der Chol.-Gehalt der ohne zusätzliches Chol. gefütterten Tiere in allen 3 Gruppen denen der Hafertiere insofern gleich, als fast nur freies Chol. vorhanden ist. Dieses ist bei den L- und J-Tieren etwas höher als das der Hafertiere. Durch Chol.-Zusatz ändert sich das freie Chol. in keiner der Diätgruppen. Die Ester scheinen zwar in allen Gruppen anzusteigen, doch sind die Unterschiede nicht signifikant. Es bestehen also hier Unterschiede zu den Hafertieren, bei denen nach Chol.-Zusatz die Ester bedeutend zunehmen.

4. *Niere.* In der Niere verhalten sich die Chol.-Fraktionen bei den VM- und J-Tieren ohne Chol.-Beifütterung wie die der Hafertiere. Für die L-Tiere wurde infolge Analysenfehlers nur das Gesamtchol. angegeben, das ebenfalls dem der Hafertiere gleicht. Die nach Chol.-Zusatz auftretenden geringen Verschiebungen des Chol.-Gehaltes liegen nicht außerhalb des Zufallbereiches und sind somit nicht verwertbar. Lediglich die VM-Tiere lassen einen Esteranstieg erkennen.

Vergleichen wir zusammenfassend die nach Verfütterung der Mischdiäten erreichten Chol.-Werte mit den nach Verwendung von Hafer als Basaldiät erhaltenen, so stimmen sie ohne Chol.-Beifütterung gut überein.

Leber, Milz und Niere enthalten nach Fütterung aller 3 Mischdiäten wesentlich weniger Chol. als nach Fütterung von Hafer, Depotfett und Chol. Hier unterbleibt der dort bemerkte vorwiegende Esteranstieg, wie er auch nach Verfütterung von anderen Fetten festgestellt wurde (SCHETTLER[4a]).

Besprechung der Ergebnisse.

Es liegt nahe, den unterschiedlichen Chol.-Gehalt der Diäten für diese Differenzen verantwortlich zu machen. Da die Tiere das Futter nicht quantitativ aufnehmen, können die errechneten Chol.-Gehaltszahlen nur zur groben Schätzung verwandt werden.

Die L-Diät hat den höchsten errechneten Gehalt an Chol. mit rund 110 mg je 100 g Futter. Im J-Futter sind etwa 18 mg und im VM-Futter etwa 12 mg Chol. je 100 g Futter enthalten, in der kombinierten Hafer-Depotfettkost etwa 16 mg Chol. je 100 g Futter. Da zur L-Diät noch 0,5 g Depotfett neben 20 mg Chol. gegeben wurden, um bei dem mangelnden Fettgehalt des Originalfutters eine bessere Resorption zu erzielen, ist dessen Chol.-Gehalt zu berücksichtigen, so daß in 100 g L-Futter noch 16 mg Chol. enthalten sind. Die höchsten Chol.-Werte im Blut und vor allem in den Organen wurden aber nicht durch das L-Futter erzielt, sondern durch das Haferfutter mit Depotfett. Durch den *Chol.-Gehalt* des Futters können also die *Unterschiede nicht* bedingt sein.

Nach VERSÉ[5] und COOK[6] ist die angebotene *Fettmenge* für die Chol.-Resorption insofern wesentlich, als die fettreichsten Diäten die höchsten Chol.-Werte erzielen. Man könnte daher den unterschiedlichen Fettgehalt der Diäten für die Erklärung der Differenzen heranziehen.

Die J-Kost, die den höchsten Fettgehalt hat, bleibt aber unter den mit Hafer und Depotfett erzielten Werten. Darüberhinaus enthalten die Lebern der mit VM- und L-Depotfett-Futter ernährten Tiere mehr Chol. als die J-Tiere, obwohl beide Diäten weniger Fett enthalten als die J-Diät. Für die anderen Organe sind die Unterschiede zwischen beiden Diäten nicht signifikant. Der Fettgehalt kann demnach nicht für die Differenzen der Chol.-Stapelung ausschlaggebend sein. Er scheint aber für die Veresterung des Chol. in der Leber von Wichtigkeit zu sein, wie sie Sperry und Brand[7] und andere annehmen, die in Rattenleberemulsion ein chol.-veresterndes Enzym fanden. Bei den L- und J-Tieren nimmt nämlich der Chol.-Gehalt der Leber nach zusätzlicher Chol.-Fütterung deutlich auf Kosten des freien Chol. zu. Das reichliche Fettsäureangebot dieser Diät wird die Anreicherung der Ester ermöglichen. Es läßt sich hierbei nicht entscheiden, ob das in der Leber schon vorhandene freie Chol. verestert wird, oder ob neugebildete Ester in der Leber gestapelt werden und das freie Chol. die Leber verläßt.

Der Gehalt der Diäten an *Kohlenhydraten* kann schließlich auch nicht für die Unterschiede verantwortlich gemacht werden, denn die an Kohlenhydraten reichste L-Diät macht in den Organen keine sicheren Abweichungen von den VM- und J-Tieren. Ebensowenig kann der *Brennwert* der Nahrung herangezogen werden, da annähernd gleichwertige Diäten wie Hafer-Depotfett und L-Depotfett starke Unterschiede in der Chol.-Stapelung aufweisen. Schließlich muß man noch dem *Salzgehalt* der Diäten Beachtung schenken. Das L- und VM-Futter enthalten 3 bzw. 2,5% Osborn-Salzmischung[8].

Diese Salze könnten den Unterschied zu den ohne künstlichen Salzzusatz ernährten Hafer-Depotfett-Tieren erklären, wenn nicht die Ergebnisse der J-Tiere dagegen sprächen. Die J-Diät enthält keine künstliche Salzmischung, und doch reagieren die mit dieser Diät gefütterten Tiere ganz anders als die Hafertiere. Die aus den verschiedensten Salzen bestehende Osbornmischung läßt aber eine sichere Beurteilung der Ionenwirkung auf den Chol.-Gehalt nicht zu. Andererseits könnte der p_H der Asche gewisse Unterschiede bedingen, da er für die Mischfutterarten um 8,0 liegt (VM = 8,1, L = 8,0, J = 7,9), während er für Hafer im schwach sauren Bereich liegt (7—8 nach Letterer).

Somit scheint zwischen Hafer einerseits und den Mischdiäten andererseits für die Klärung der Differenzen in der Chol.-Stapelung nur noch der *Eiweißgehalt* ausschlaggebend sein zu können. Im Gegensatz zum Hafer enthalten alle Mischfutterarten tierisches Eiweiß aus Milch oder Plazenta. Die VM-Diät enthält außerdem 19% Kasein. 32,2% aller Kalorien werden in der VM-Diät von Eiweiß geliefert, 15,0% in der L-Diät und 15,4% im J-Futter. Beim Hafer-Depotfett-Futter sind

es nur 10,1%. Diese Prozentzahlen scheinen aber weniger wichtig als die Herkunft der Eiweiße und damit ihre Zusammensetzung.

Zwischen pflanzlichem und tierischem Eiweiß bestehen bedeutsame Unterschiede, worauf HERKEN und REMMER[9] kürzlich hinwiesen. Darüberhinaus greift das Eiweiß bei der Entstehung experimenteller Fettlebern ein (CHANNON und Mitarbeiter[10–14]). CHANNON konnte durch Eiweißzusatz zu einer fettlebererzeugenden Kost, die wenig Kasein, viel Fett und Chol. enthielt, die Stärke der Leberverfettung verringern. Fischmehl, Kasein, Eieralbumin, Fibrin und Zein waren dabei stärker wirksam als z. B. Edestin, Gelatine, Gliadin, wenn Kasein Basaleiweiß war.

Dieses Basaleiweiß ist für die Fettleberentstehung sehr wichtig. Die Aktivität der Eiweißkörper bei der Fettablagerung (lipotrope Potenz) ist weitgehend eine Funktion der Aminosäuren. Bei eiweißarmer Kost und Zusatz von 0,2 oder 0,5 g Zystin entstehen Fettlebern, bei Methioninzusatz bleiben sie aus. Methionin hemmt die Entstehung von Fettlebern und auch die nach Chol.-Fütterung einsetzende Neutralfett- und Chol.-Ablagerung.

Unter 14 geprüften Aminosäuren hat neben dem Methionin das Tryptophan die Eigenschaft, eine durch Chol. und fettreiche, eiweißarme Diät hervorgerufene Neutralfett- und Chol.-Ablagerung in der Leber zu verhindern. Zystin läßt das Chol. unbeeinflußt, erzeugt dagegen Neutralfettlebern. Dem Methionin kommt insofern eine weitere Bedeutung zu, als es die Muttersubstanz für die biologische Synthese des Cholins darstellt (MC.KIBBIN, THAYER, STARE[15], CHAIKOFF, MONTGOMERY, ENTENMAN[16]). Cholin entwickelt die am stärksten hemmende Potenz bei der Fett- und Chol.-Ablagerung in der Leber (BEST und RIDOUT[17], BEST, LUCAS, PATTERSON, RIDOUT[18], DU VIGNEAUD und Mitarbeiter[19], CHANNON und SMITH[20]), so daß dem Methionin in diesem Zusammenhang wohl die bedeutendste Rolle zufällt (s. auch [21]).

Die Beurteilung der Diäten ist insofern erschwert, als sie Mischfutterarten und keine auf die einzelnen Aminosäuren abgestellten Kostformen darstellen. Zwischen Hafer, Weizen, Gerste, Mais und Vollmilchpulver, den hauptsächlichsten Bestandteilen der Mischdiäten, bestehen nach BLOCK[22] gewichtige Unterschiede im Aminosäuregehalt, und man könnte geneigt sein, etwa dem niedrigen Methioningehalt des Hafers und dem hohen Tryptophangehalt der Milch eine Bedeutung für die unterschiedlichen Ergebnisse zuzusprechen. Man wird diese Zusammenhänge aber nur durch Verfütterung reiner Aminosäuren entscheiden können.

So darf aus den vorliegenden Ergebnissen nur geschlossen werden, daß der Eiweißgehalt der verwandten Diäten die Chol.-Anreicherung in Blut und Organen, wie sie nach Verwendung von Hafer als Grundkost auftritt, hemmt. Frühere Versuche amerikanischer Autoren werden insofern ergänzt, als neben der Leber auch Milz und Niere diese Einwirkungen erkennen lassen.

Es kommt den Eiweißkörpern anscheinend nicht nur eine chol.-fettleberverhindernde Wirkung, sondern ein hemmender Einfluß auf die Chol.-Verfettung der Organe allgemein zu.

Zusammenfassung.

Es wird der Einfluß verschiedener Basaldiäten auf die experimentelle Cholesterinmast bei Mäusen untersucht. Die 3 geprüften Diäten hemmen

die Chol.-Anreicherung in Blut, Leber, Milz und Niere, wie sie bei Verwendung von Hafer als Grundfutter gefunden wurde. Dem Eiweißgehalt der Diäten kommt dabei die hauptsächlichste Bedeutung zu. Die Wirkungsmöglichkeit einzelner Aminosäuren, besonders des Methionins und Tryptophans wird diskutiert.

Literatur.

[1] Schettler: Biochem. Z. **319**, 349 (1949). — [2] Schettler: Klin. Wschr. **1948**, 566. — [3] Koller: Graphische Tafeln usw. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff 1940. — [4] Kruckenberg: Hoppe-Seylers Z. **283**, 68 (1948). — [4a] Schettler: Biochem. Z. **319**, 444 (1949). — [5] Verse: Verh. dtsch. path. Ges. **1925**. — [6] Cook Biochem. J. (Brit.) **30**, 1630 (1936); **31**, 410 (1937); **32**, 11, 91 (1938). — [7] Sperry and Brand: J. biol. Chem. (Am.) **141**, 545 (1941). — [8] Bomskov: Method. der Vitaminforschung. Leipzig: Georg Thieme 1935. — [9] Herken u. Remmer: Ärztl. Wschr. **1946**, Nr 19/20. — Klin. Wschr. **1947**, Nr 13/14 u. 29/30. — [10] Channon: Annual Rev. Biochem. (Am.) **9**, 231 (1940). — [11] Cannon, Loach, Loizides, Manifold and Soliman: Biochem. J. (Brit.) **32**, 976 (1938). — [12] Channon, Manifold and Platt: Biochem. J. (Brit.) **32**, 969 (1938). — [13] Channon, Platt and Smith: Biochem. J. (Brit.) **31**, 1736 (1937). — [14] Channon, Mills and Platt: Biochem. J. (Brit.) **37**, 483 (1943). — [15] Mc.Kibbin, Thayer and Stare: J. Lab. a. clin. Med. (Am.) **29** (1944). — [16] Chaikoff, Montgomery and Entenman: J. biol. Chem. (Am.) **160**, 489 (1945). — [16] Best and Ridout: J. Physiol. (Brit.) **78**, 415 (1933); **86**, 343 (1936). — [18] Best, Lucas, Patterson and Ridout: Biochem. J. (Brit.) **40**, 368 (1946). — [19] Du Vigneaud, Chandler, Simmonds, Choyer and Cohn: J. biol. Chem. (Am.) **165**, 639 (1946). — [20] Channon and Smith: Biochem. J. (Brit.) **30**, 115 (1936). — [21] Annual Rev. Biochem. (Am.) **16** (1947). — [22] Block: Advanc. i. Prot. Chem., S. 122. New York 1945. Siehe auch Herken u. Remmer: Klin. Wschr. **1947**, 211.

Dr. G. Schettler, Tübingen, Pathologisches Institut der Universität.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 388—408 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig.

Über die Frage einer Vaguswirkung von Digitalisglykosiden*.

Von

Friedrich Hohensee und Ludwig Lendle.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Oktober 1948.)

Im Verlauf der therapeutischen Digitaliswirkung bei insuffizienten Herzen gehört neben dem Gewichtsverlust infolge Ausschwemmung der Gewebsödeme die Pulsverlangsamung zu den eindrucksvollsten Veränderungen des klinischen Wirkungsbildes. Sie wird vom Arzt geradezu als Maß der therapeutischen Wirksamkeit gewertet. Wenn aber infolge langdauernder Überdosierung die Pulsfrequenz sogar unter normale Bereiche absinkt, so wird diese chronotrop hemmende Wirkung als ein wichtiges Zeichen einer kumulativen Digitalisvergiftung aufgefaßt. Bei tierexperimenteller Prüfung konnte nachgewiesen werden, daß dieser Einfluß der Digitalisglykoside auf die Herzfrequenz durch Vagusausschaltung (Vagotomie oder Atropinisierung) aufgehoben werden kann.

Ältere Kliniker wie Traube hielten diese Vaguswirkung der Digitalis für das Wesentliche und rechneten die Droge unter die Beruhigungsmittel für das Herz**. Auch bis in die neueste Literatur hinein (vgl. bei Weese[1], Lendle[2], Edens[3]) ist diese Auffassung vertreten worden, daß die Pulsverlangsamung durch Digitalis für die Verbesserung und Ökonomisierung der Herzleistung von wesentlicher Bedeutung ist. Man hat geradezu von einer „Elementarwirkung" der Digitalis auf den Vagus parallel der auf den Muskel gesprochen. Freilich ergaben sich bald verschiedene Deutungsmöglichkeiten für den Angriffsort dieser Vaguswirkung. Die einfache schematische Auffassung, daß kleine Digitalisgaben den Vagus peripher oder zentral erregen und große ihn lähmen, erwies sich als unhaltbar. Auch die Versuche, diese Digitalisbradykardie indirekt über eine Erregung der Pressorezeptoren im Karotissinus oder auch der Chemorezeptoren im gleichen Gebiet zu erklären, waren unbefriedigend. Nur Heymans und Mitarbeiter[4] vermochten unter Digitaliswirkung eine Sensibilisierung des Karotissinus nachzuweisen, so daß die gleichen Drucksteigerungen eine 25% stärkere Herabsetzung der Frequenz auslösten. Abdon und Nielsen[5] haben jedoch eine solche Wirkung bestritten. Es ist wohl auch kritisch dazu zu sagen, daß weder solche Giftkonzentrationen längere Zeit von der Blutbahn aus am Sinus wirksam werden können, noch daß überhaupt in den meisten Fällen selbst solche geringe Blutdrucksteigerungen unter Digitalis erfolgen.

Von klinischer Seite ist neuerdings die Frage einer zentralen Vaguswirkung der Digitalis durch R. Marx und Mitarbeitern[6] wieder aufgenommen worden. Diese Autoren beobachteten nach Gaben, die bei intravenöser Injektion ohne Wirkung blieben, bei Injektion in den 3. Ventrikel von Hunden typische Ver-

* Herrn Prof. E. Frey, Göttingen, zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Zit. nach Weese: Digitalis, S. 197. Leipzig 1936.

änderungen am EKG, die bei Vagotomie ausfielen. Daraus schlossen sie auf eine zentralnervöse Regulierung der Herztätigkeit, an welcher auch die therapeutische Digitaliswirkung angreifen könne. Die Ergebnisse erscheinen nicht sehr überzeugend. Die Injektion von mehr als 100 γ intrazisternal bedeutet bei dem stark zellschädigenden Charakter der saponinartigen Glykoside wohl eine unspezifische Reizwirkung auf nervöse Elemente, die sich vielleicht auch auf die Vaguskerne erstrecken oder überspringen kann. Auch eine von Veil und Heilmeyer[7] nach klinischen Beobachtungen über zweiphasische Beeinflussung der Drüsensekretion und veränderte Magenmotilität u. a. nach Digitalisgaben vertretene Auffassung über eine direkte Vaguswirkung der Digitalis, hat wohl keine weitere Anerkennung gefunden. Es dürfte sich dabei vielleicht zum Teil um „mittelbare" Digitaliswirkungen im Sinne von Edens über veränderte Kreislaufverhältnisse handeln.

In der Deutung der „Vaguswirkung der Digitalis" herrscht heute meist die von W. Straub[8] angeregte Auffassung, die sich auf ältere Beobachtungen von Boehm[9] gründet, vor, daß Digitalisglykoside keine direkte Vaguserregung, weder peripher noch zentral noch reflektorisch auslösen, sondern daß sie das Herz für den normalen Vagustonus empfindlicher machen. Weese[1] (S. 198) spricht in diesem Sinne von einer Sensibilisierung für den normalen Vagustonus als „Urwirkung der Digitalis auf das Herz".

Für diese Auffassung sind neuerdings gewichtige Argumente von Gremels[10, 11] vorgelegt worden. Er wies nach, daß die dämpfende Wirkung von Azetylcholindauerinfusionen auf den Stoffwechsel des Herzens, womit er den natürlichen Vagustonus am isolierten Herz-Lungenpräparat zu ersetzen versuchte, nach Digitalisvorbehandlung wesentlich verstärkt werden kann. Nach seinen Befunden berechnet er zahlenmäßig, daß diese Sensibilisierung sogar tausendfach schwächere Azetylcholindosen noch wirksam machen kann. Diese Feststellung gewinnt eine besondere Bedeutung im Rahmen der von Gremels vertretenen Theorie, daß der mechanischen Insuffizienz des Herzens eine „Stoffwechselinsuffizienz" vorausgehe und daß Digitalisglykoside über ihre Vaguswirksamkeit durch Ökonomisierung primär die Stoffwechselinsuffizienz beseitigen — daß also wohl die Digitaliswirkung über eine Sensibilisierung für den Stoffwechseleffekt des Vagus zustande käme. In der gleichen Arbeit berichtet Gremels auch, daß am isolierten Froschherzen die Wirksamkeit von Azetylcholin, also des Überträgerstoffes der Vaguserregung, durch Vorbehandlung mit Strophanthin und Digitalis verstärkt wird.

Es ist bis jetzt aber nicht gelungen, eine Hemmung der Esterasewirkung und dadurch etwa bedingte Sensibilisierung für den Vaguseffekt nachzuweisen (Matthes[12], Abdon und Nielsen[5], Kull[13], Zinnitz[14]). Es bleibt also noch die Frage offen, wie die Sensibilisierung der Vaguswirkung am Herzen zustande kommt.

Gelegentlich ist auch der Versuch unternommen worden, unter Strophanthineinwirkung eine Freisetzung des „Vagusstoffes" als Ausdruck einer erhöhten

Vaguserregung im Herzmuskel nachzuweisen. Dies gelang wohl nur unter Einwirkung von toxischen Digitaliskonzentrationen (Kull[13], Genuit[15]).

Die bei besonders schweren kumulativen Digitalisvergiftungen auftretende Tachykardie mit Irregularitäten ist früher auch über eine Vaguswirkung, und zwar im Sinne einer Lähmung, gedeutet worden, weil in diesem Stadium der Vergiftung noch Beobachtungen von v. Lhota[16] und vielen späteren Autoren durch Vagusreizung keine Hemmung dieser erregten Herztätigkeit mehr zu erzielen ist. Es stellte sich aber schon bald heraus, daß es sich dabei um keine atropinartige Lähmung, sondern eine „scheinbare Vaguslähmung" handelt, weil die unter toxischen Digitalisdosen in tertiären Zentren vermehrt gebildeten Reize nicht wie die nomotope Reizbildung durch Vagusreizung gehemmt werden kann (Rothberger und Winterberg[17]).

Im Rahmen eigener Studien über solche „scheinbare Vaguslähmungen" durch Kampfer, Koffein, Nikotin u.a. herzwirksame Stoffe und in Erweiterung früherer negativer Bemühungen von Gerlach[18] und Schleypen[19], eine Sensibilisierung von Vaguseffekten am Froschherzen durch Vorbehandlung mit Strophanthin und anderen Stoffen zu erzielen, haben wir diese wichtige Frage wieder aufgenommen und setzten mit unseren Versuchen bei einer Wiederholung der alten Beobachtungen von Boehm ein.

I. Allgemeine Methodik.

Wir bemühten uns, Sensibilisierungen der Vaguswirkung zu erfassen aus einer verstärkten und verlängerten Herzhemmung bei elektrischer Reizung des Vagus oder aus einer verstärkten Wirksamkeit von Doryl oder Azetylcholin.

Die Vagusreizung erfolgte, um gleichmäßige und reproduzierbare variable Reize setzen zu können, mittels faradischer Stromstöße mit einer Frequenz von 40—50, da ein Schwingungskreis nicht zur Verfügung stand. Diese Stromstöße wurden erzeugt durch einen Induktionsschlittenapparat unter Verwendung einer Akkubatterie von 4 Volt. Dabei wurde im sekundären Stromkreis die Stromstärke mittels Potentiometer variiert*. Die Rollenabstände des Induktionsapparates blieben während jedes Versuches konstant, so daß die Reizstärke durch die Variation am Potentiometer** dosiert werden konnte.

Für die Vagusreizung wurden die Reizelektroden aus Kupfer- bzw. Platindraht teils am eröffneten Schädel im Gebiet des verlängerten Markes (= Medullarreizung), teils am isolierten Vagusstamm im Halsgebiet („Stammreizung"), teils am Sinus („Sinusreizung") angelegt. Es ist eine viel beschriebene Tatsache, daß Vagusreizungen bei Fröschen besonders in verschiedenen Jahreszeiten mehr oder weniger kurze oder gar keine Herzstillstände auslösen, weil im peripheren Vagus

* Mit gleichem Reizverfahren hat neuerdings E. Brauereisen[20] chronotrope Wirkungen bei Reizung extrakardialer Nerven geprüft. In dieser Arbeit findet sich auch eine kritische Übersicht über die methodischen Möglichkeiten, die Vagus- und Akzeleransfasern getrennt elektrisch zu reizen.

** P.W. 16 z. B. bedeutet im folgenden Potentiometerwert 16. Wir eichten unser Potentiometer am Meßinstrument so, daß die Potentiometerzahlenwerte in einem linearen Verhältnis zur Stromstärke standen, und von 1 als niedrigster Wert bis zu 16 als höchster Reizstärke anstiegen.

auch Akzeleransfasern verlaufen, deren Mitreizung einer Herzhemmung entgegenwirkt (Literatur bei Langecker[21]). So ist nach Cori[22] besonders in den Frühjahrs- und ersten Sommermonaten meist mit negativen Vaguseffekten zu rechnen („Sympathikusfrösche"). Von einigen Autoren (Gaskell[23]) wird angegeben, daß die Reizung des Medullarquerschnittes in zuverlässigerer Weise reine Vaguseffekte liefert. Freilich muß bei diesem Reizverfahren mit einer kürzeren Lebensfähigkeit des Vaguskernes gerechnet werden, so daß die Reizmöglichkeiten während der Versuchsdauer oft zeitlich begrenzt blieben.

Es wurden 3 Versuchsreihen angesetzt:

1. Beobachtungen am suspendierten Herzen des gefensterten Frosches;

2. Versuche am „vagusinnervierten Straub-Herzen in situ";

3. Versuche am isolierten Froschherzen nach Straub.

Die Registrierung der Herztätigkeit erfolgte in der 1. Versuchsreihe wie bei Boehm am suspendierten Herzen durch Zählung der Frequenz und Messung der Dauer des Herzstillstandes nach dem Reiz. Beim Vagusreiz am Hals wurden beide Halsvagi nach Entfernung der vorderen Extremität an der ventralen Seite des Unterkieferastes aufgesucht und vorsichtig über die dünnen Elektroden gelegt. Beim Sinusreiz wurde die Platinelektrode am herznahen Teil des Sinus ohne Druck angelegt. Die Giftlösungen wurden subkutan in beide Schenkellymphsäcke gespritzt.

In der 2. Versuchsreihe wurden Untersuchungen am „vagusinnervierten Straub-Herzen" ausgeführt, indem nach Einführung der Straub-Kanüle durch die rechte Aorta unter sorgfältiger Erhaltung der Vagusfasern das ganze Vorderteil des Frosches auf einem Holzbrett befestigt, über dem Registrierhebel montiert wurde. Die linke Aorta blieb unter Schonung der zuführenden Nervenfasern unberührt. Der Kanüleninhalt betrug 1 cm^3, die Reizdauer betrug allgemein 10 sec, die Reizschwelle wurde durch Variation des Potentiometers (500 Ω), dessen Skala in 16 Teilstriche unterteilt war, gesucht.

Die Lebensdauer der einzelnen Präparate war schon ohne Giftzusatz verschieden. Bei der Vagusreizung von der Medulla aus blieb die Reaktionsfähigkeit des Vagus selten länger als 20 min erhalten. Es müssen daher Versuche, in denen eine Vaguslähmung beobachtet wird, kritisch bewertet werden. Nur dann, wenn die Vaguserregbarkeit nach Entfernung des Giftes wiederkehrt, kann eine echte Vaguslähmung angenommen werden. Für Sensibilisierungsversuche über längere Beobachtungszeit bei Einwirkung niedriger Digitaliskonzentrationen ist dieses Verfahren weniger geeignet. Auch bei Versuchen mit Vagusreizung am Hals ist nach der Literatur (Gellhorn[24]) bekannt, daß der Vagus wärmeempfindlich ist. Wir führten unsere Versuche in der Zeit von Mai bis August 1948 durch. Vor Gebrauch wurden die Frösche mindestens 3 Tage bei 8° C im Eisschrank aufbewahrt. Es wurden durchweg Wasserfrösche mit mindestens 40 g Gewicht verwandt. Bei der Vagusreizung am Stamm blieb die Erregbarkeit nach unseren Erfahrungen einige Stunden erhalten. Es gelang uns jedenfalls nach 2—3 Std noch Herzstillstand bei Vagusreizen von 10 sec Dauer auszulösen. Zum Schutz gegen Austrocknung mußte das Präparat öfter mit Ringerlösung befeuchtet werden. Am wenigsten empfindlich erwies sich der Sinus, von dem man viele Stunden lang durch Reizung Herzstillstand erzielen konnte. In einem Fall beobachteten wir ein Präparat über 8 Std lang, ohne wesentliche Veränderungen zu sehen.

Die Präparation des isolierten Froschherzens nach Straub wurde nach der üblichen Methode vorgenommen. Auch hier betrug die Kanülenfüllung stets 1 cm^3. zur Herstellung der Lösungen verwandten wir k-Strophanthin (Merck) und

Atropin. sulf. (Merck) in Substanz. Das Doryl (Merck) wurde den im Handel befindlichen Ampullen (Inhalt 0,00025 g) entnommen. Zur Herstellung der Azetylcholinlösungen benutzten wir die Trockenampullen der Firma Hoffmann-La Roche. Die Lösungen wurden tropfenweise zugesetzt und danach die einwirkenden Konzentrationen berechnet.

II. Versuche am Herzen in situ am gefensterten Frosch.

Mit der im Teil I beschriebenen Methodik wurden insgesamt 23 Versuche ausgeführt, die in den wesentlichen Ergebnissen volle Übereinstimmung zeigten und auch die Beobachtungen Boehms bestätigten. Freilich muß die Ausdeutung seiner Ergebnisse heute anders vorgenommen werden.

In einer Gruppe (16 Versuche) wurden die Frösche zur Ausschaltung unerwünschter Muskelzuckungen bei der elektrischen Reizung mit Kurare bzw. Kurarin vorbehandelt. Es fand eine 1%ige wäßrige Lösung des Merckschen Kurare Verwendung. Je Tier gaben wir 0,2—0,3 cm^3 subcutan. Um die in der Literatur* beschriebenen Vaguswirkungen des Kurare auszuschalten, wurde bei der Mehrzahl der Versuche (11) 0,1 bis 0,25 cm^3 einer wäßrigen Curarinlösung 10^{-3} benutzt. Die dafür verwendete Substanz wurde im Leipziger Institut noch von Boehm selbst im Jahre 1904 hergestellt und war von ihm mit einer „+-Dosis 0,35 bis 0,40 mg-%/kg" signiert. Sie war also nahezu ein Reinstpräparat.

Bei 7 Versuchen wurden die Tiere mit 1 cm^3 einer 20% wäßrigen Urethanlösung narkotisiert. Die dabei beobachteten Besonderheiten werden im folgenden noch beschrieben werden.

Vor der Präparation wurden die Tiere dekapitiert, in einigen Fällen wurde das Rückenmark ausgebohrt, einige Versuche wurden auch bei erhaltenem ZNS durchgeführt, ohne daß dabei ein Unterschied in den Versuchsergebnissen zu finden war. Dem Frosch wurde dann in Rückenlage der Thorax eröffnet, das Herz vorsichtig aus seinen Häuten präpariert, die Herzspitze mit einer serre-fine gefaßt und mit einem Stativ ohne Zug so suspendiert, daß man den Sinus übersehen konnte. Mehrfache Frequenzzählungen der Herzaktion führten zum Ausgangswert. Durch Sinusreizung wurde die Reizschwelle (just maximal) ermittelt, der Herzstillstand mit Stoppuhr gemessen. Die so gefundene Reizstärke wurde allgemein während des Versuches nicht verändert. Um gleichmäßige Bedingungen zu unterhalten, reizten wir in 5 min dreimal. Dann wurde k-Strophanthin (10—40 γ auf 10 g Frosch) gegeben, und jeweils alle 5 min post injectionem (p. i.) die Zahl der Kontraktionen gezählt, dabei dreimal gereizt, so daß wir mit einer Frequenzzählung das Ergebnis von 3 dazugehörigen Reizen direkt vergleichen konnten. Besonderheiten des Kontraktionsverlaufes wurden mit Angabe der Zeit vermerkt.

Nach Strophanthin veränderten sich Frequenz und Reizerfolg zunächst nicht. Nach etwa 20—70 min p. i. (abhängig von der Strophanthinmenge) zeigten sich die ersten toxischen Symptome bei unveränderter Frequenz. 30—80 min p. i. begann die Frequenz erheblich

* Boehm: In Hefters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II/1, S. 202ff.

(um 30—40% des Ausgangswertes) abzusinken. Ein Reiz wurde dann mit einem sehr langen Herzstillstand (20—200 sec) beantwortet. Dieser Zustand hielt bis zum Absterben des Präparates (im systolischen Stillstand) nach ungefähr 80—150 min p. i. an.

Aus einem unserer Protokolle als Beispiel läßt sich dieser Ablauf deutlich entnehmen:

Versuch Nr. IX c. 30. 6. 48. Esculenta 50 g. 0,2 cm³ Kurarin 10^{-3} subkutan, nicht dekapitiert, gefenstert.

Versuchszeit	Frequenz	Dauer des Stillstandes nach 10 sec Vagusreiz	Beobachtungen
Vorperiode	56	kein Stillstand	„Sympathikusfrosch"
	k-Strophanthinlösung 10^{-4} 0,1 cm³ auf 10 g Frosch		
5 min p. i.	56	kein Stillstand	
10 min p. i.	56	kein Stillstand	
55 min p. i.	55	kein Stillstand	Beginnende Kammerperistaltik
110 min p. i.	30	— 10 sec, 12 sec	
115 min p. i.	28	17 sec, 15 sec, 16 sec	
120 min p. i.	22	18 sec, 16 sec, 15 sec	
125 min p. i.	22	54 sec *	Irregularitäten
130 min p. i.	20	65 sec	
135 min p. i.	20	120 sec	
140 min p. i.	18	180 sec	
150 min p. i.			Herzstillstand, Präparat tot.

Ergebnisse: Bradykardie nach 110 min. Kammerperistaltik nach 55 min. Vaguseffekt nach 110 min erstmalig auftretend, Verstärkung des Vaguseffektes mit zunehmender Frequenzverminderung.

Die weiteren Befunde sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In der Tabelle ist auch am Ende ein Versuchsprotokoll von Boehm selbst eingeschlossen, welches in gleicher Weise wie unsere Versuche ausgewertet wurde. Es zeigt sich dabei anschaulich die Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen.

Als Ergebnis der in der Tabelle 1 vorgelegten Versuche sei kurz zusammengefaßt:

1. In keinem Falle sahen wir eine Bradykardie im „therapeutischen" Stadium der Strophanthinwirkung auftreten. Der Ausdruck therapeutisch darf hier und weiterhin mit dem Vorbehalt verwandt werden, daß es sich nur um Herzen gesunder Tiere handelte. Dem Frequenzabfall zur Bradykardie gingen ausnahmslos Zeichen der toxischen Strophanthinwirkung voraus. Als solche wurden Vorhof-Kammerdissoziation (z. B. 1:2 Block), Kammerwühlen und Peristaltik und spontane Irregularitäten angesehen.

2. In jedem Fall wurde ein sogenannter „Sympathikusfrosch", d. h. ein Präparat, welches bei Sinusreizung bzw. Reizung am Hals keinen

* Ab hier und im folgenden mußte wegen der langdauernden Herzstillstände von öfteren Reizungen Abstand genommen werden.

Tabelle 1. *Versuche am suspendierten Froschherzen in situ.*

A	B	C	D	E				F				G
				1	2	3	4	5	6	7	8	
0,3 Kurare 1%	56	2	0,20 cm³ 1:20000	75/26	90	100	125	Sinus	75 100	26 20	10 28	Ic
0,2 Kurare 1%	60	2	0,4 cm³ 1:10000	55/32	50	80	90	Sinus	55 75	32 30	20 180	IIc
0,3 Kurare 1%	40	2	0,3 cm³ 1:10000	45/32	70	75	90	Sinus	50	20	200	IIIc
0,25 Kurare 1%	60	—	0,27 cm³ 1:10000	45/26	30	55	95	Sinus	58	20	133	IVc*
0,2 Kurare 1%	60	—	0,2 cm³ 1:10000	45/25	35	55	75	Sinus	65	18	108	Vc*
0,1 Kurarin 1:1000	46	6	0,15 cm³ 1:10000	45/38	–	80	85	Sinus	80	35	74	VIc
0,1 Kurarin 1:1000	50	3	0,1 cm³ 1:10000	65/26	55	65	80	Sinus	65	26	10	VIIc
0,15 Kurarin 1:1000	52	6	0,2 cm³ 1:10000	85/16	60	100	114	Sinus	100	12	125	VIIIc
0,2 Kurarin 1:1000	56	—	0,1 cm³ 1:10000	110/36	55	125	150	Sinus	130 135 140	20 20 15	65 126 180	IXc
1,0 Urethan 20%	28	—	0,1 cm³ 1:10000	30/16	20	20	45	Sinus	35 40	12 8	32 41	XIVu
1,0 Urethan 20%	46	15	0,15 cm³ 1:10000	20/22	20	20	28	—	—	—	—	XVIIu**
1,0 Urethan 20%	38	6	0,2 cm³ 1:10000	10/26	10	10	20	Sinus	—	—	—	XVIIIu
1,0 Urethan 20%	46	10	0,1 cm³ 1:10000	40/26	10	16	60	Sinus	—	—	—	XIXu
0,7 Urethan 20%	36	7	0,15 cm³ 1:10000	40/16	25	40	83	Sinus	70 75 60	12 10 10	30 120 225	XXu
	57	—	2 gtt Digitalin	37/24	19	59	84	Sinus	37 80	24 21	50 300	IV***

A Vorbehandlung mit Kurare, Kurarin oder Urethan. B Herzfrequenz in 1 min. C Dauer des Vagusstillstandes nach Sinusreiz vor Strophanthingabe. D Strophanthindosis auf 10 g Frosch. E Vergiftungserscheinungen in Minuten nach der Strophanthingabe:

Herzstillstand zeigte, durch Strophanthin zum „Vagustier". Die Strophanthinwirkung führte also *immer* zur Reizbeantwortung durch Herzstillstand.

3. Das Stadium des extrem verlängerten Vagusstillstandes ist auffälligerweise mit einer starken und schnell eintretenden Frequenzverminderung verbunden, so daß sich die Vermutung einer Koppelung dieser beiden Vorgänge uns geradezu aufdrängte. Aus den Boehmschen Originalprotokollen ist diese Beziehung auch schon ganz deutlich ersichtlich, ohne daß Boehm darauf ausdrücklich hinwies.

Die vorstehend beschriebenen Versuche zeigten, daß trotz Vaguslähmung durch das Kurarepräparat bei der Digitalisvergiftung in späteren Stadien langanhaltende Vaguseffekte auftraten. Diese Tatsache gab Anlaß zu prüfen, ob Atropin sich antagonistisch zu diesem Vaguseffekt verhält. Boehm versuchte schon die Vagusreaktion nach Digitalis durch Atropingaben zu durchbrechen. Wir folgten anfangs seinem Vorgehen, indem wir 1—2 gtt einer wäßrigen Atropinlösung 10^{-3}—10^{-4} direkt auf Herz und Sinus tropften. Wir sahen aber dadurch keine Veränderung des Herzstillstandes nach Reizung. Dies führten wir zunächst auf ungenügende Resorptionsbedingungen zurück. Wir gaben daher als Vorbehandlung nach dem Kurarin 0,1—0,2 cm³ Atropin. sulf. 5×10^{-3} je 10 g Frosch subkutan. Natürlich konnten wir bei so vorbehandelten Tieren als Ausgangswert auch mit größter Reizstärke keinen Herzstillstand erzielen, sie imponierten als „Sympathikusfrösche". Aber hier fanden wir nach Strophanthingaben gleicher Größe wie in den vorausgegangenen Versuchen im Verlauf der Vergiftung auch die extrem verlängerten „Vagusstillstände" nach der Reizung. Wir bringen auch hiervon einen Protokollauszug. Die anderen Versuche sind in Tabelle 2 enthalten.

1 Frequenzverminderung nach .... min p. i.; 2 Herzperistaltik nach .... min p. i.; 3 Irregularität nach .... min p. i.; 4 Herztod nach .... min p. i. F Vaguswirkungen: 5 Reizort; 6 Zeit in .... min p. i.; 7 Frequenz vor der Reizung in .... min p. i.; 8 Dauer des Herzstillstandes in .... sec nach 10 sec Reiz. G Versuchsnummer.

* Bei Versuch IVc und Vc gaben wir je 1 gtt Atropin 10^{-4} auf Herz und Sinus (64 bzw. 69 min p. i.), ohne eine Veränderung des Vaguseffektes nach Reizung zu sehen.

** In diesem und den folgenden Versuchen narkotisierten wir die Frösche mit Urethan und beobachteten dabei eigenartigerweise ein schnelleres Absterben des Präparates nach der Strophanthingabe. Eine Tatsache, für die wir zur Zeit eine eindeutige Erklärung noch nicht geben können.

*** Wir haben hier ein Originalprotokoll von Boehm (Pflügers Arch. 5, 184) in gleicher Form eingetragen. Die auffällige Übereinstimmung mit unseren Versuchsergebnissen ist in dieser Anordnung besonders deutlich.

Versuch Nr. XIca. 28. 6. 48. Esculenta 55 g, nicht dekapitiert, gefenstert. 0,25 cm³ Kurarin 1:1000, 0,1 cm³ Atropin 1:2000 auf 10 g Frosch.

	Frequenz	Stillstand nach 10 sec Reiz			Bemerkungen
Vorperiode	66	—	—	—	„Sympathikusfrosch"
	0,75 cm³ k-Strophanthin 1:10000 auf 10 g Frosch				
5 min p. i.	60	—	—	—	
10 min p. i.	56	—	—	—	
55 min p. i.	44	—	—	—	
60 min p. i.	44	—	—	—	Irregularität
65 min p. i.	20	—	30 sec,	45 sec	
70 min p. i.	20	80 sec			
79 min p. i.		Kammerstillstand			
82 min p. i.		Herzstillstand, Präparat tot.			

Ergebnis: Irregularität nach 60 min Bradykardie nach 65 min. Vaguseffekt nach 65 min p. i. erstmalig. Der Effekt der Vagusreizung am strophanthinvergifteten Froschherzen mit extrem langem Herzstillstand nach Vagusreizung kann also auch am atropinisierten Frosch beobachtet werden.

III. Versuche am vagusinnervierten Straub-*Herzen in situ.*

Die vorausgegangenen Versuche am gefensterten Frosch mit suspendiertem Herzen hatten einige Nachteile aufzuweisen insofern, als durch den eröffneten Thorax die Resorptionsbedingungen für Strophanthin verschlechtert waren und durch die Mitwirkung der Narkose bzw. die Kurarisierung die Beurteilung der Ergebnisse etwas erschwert wurde. Insbesondere war aber die Prüfung des Atropinantagonismus in den späteren Stadien der Strophanthinvergiftung nicht ganz zuverlässig. Eine exakte Atropindosierung war nur bei Atropingabe vor Versuchsbeginn möglich.

Es wurden daher Versuche am isolierten Froschherzen in situ mit erhaltenen Nerven an der Straub-Kanüle ausgeführt, wo Gift und Gegengift in beliebiger Konzentration schnell und gleichzeitig zur Einwirkung gebracht werden können. Ein ähnliches Präparat wurde schon von Hou und Brücke[25] und von Gerlach[18] verwandt. Die methodischen Einzelheiten der Präparation sind im 1. Teil dieser Arbeit erwähnt.

Zur allgemeinen Versuchsanordnung ist folgendes zu sagen: Die Vagusreizung erfolgte in 13 Versuchen am Stamm und in 1 Versuch mit gleichem Ergebnis am Sinus. Nach Einstellung der sicher wirksamen Reizschwelle wurde zum Kanüleninhalt (1 cm³) je 1—2 Tropfen einer k-Strophanthinlösung 1:30000 gegeben, so daß Giftkonzentrationen von meist 1:300000 zur Einwirkung kamen, die das Herz in etwa 45 min zum Stillstand brachten und schon in 25 min Irregularitäten und Bradykardie auftreten ließen. Atropin wurde teils erst in späten Stadien der Vergiftung, wo schon lange Herzstillstände auf Vagusreiz erfolgten, teils aber auch schon in den früheren Stadien der

Tabelle 2.

Versuche am suspendierten Froschherzen in situ nach Atropinvorbehandlung.

A	B	C	D				E				F
			1	2	3	4	5	6	7	8	
52	0,2 cm³	0,3 cm³	50/22	45		75	Sinus	50	22	97	X
	1:10000	1:10000					Sinus	60	12	135	
66	0,15 cm³	0,1 cm³	65/20		60	80	Sinus	65	20	45	XI
	1:10000	1:2000					Sinus	70	20	80	
54	0,08 cm³	0,1 cm³	70/36		45	105	Sinus	80	28	17	XII
	1:10000	1:2000					Sinus	85	18	104	
							Sinus	90	16	158	
44	0,12 cm³	0,3 cm³	25/20	10	30	40	Sinus	25	20	5	XIII
	1:10000	1:10000					Sinus	35	18	22	
50	0,15 cm³	0,15 cm³	75/22	55	70	100	Sinus	75	22	12	XXI
	1:10000	1:2000					Sinus	80	16	85	
							Hals	80	16	147	
62	0,2 cm³	0,15 cm³	40/36	30		53	Sinus	40	36	30	XXII
	1:10000	1:2000					Hals	40	36	20	
							Sinus	45	32	80	
							Hals	45	32	50	
58	0,25 cm³	0,15 cm³	25/18	20		35	Hals	20	20	16	XXIII
	1:10000	1:2000					Sinus	20	20	10	
							Hals	25	20	18	
							Sinus	25	20	14	
							Hals	30	16	50	
							Sinus	30	16	50	
34	0,2 cm³	0,3 cm³	10/16	20	20	19					
	1:10000	1:10000									XV*
30	0,1 cm³	0,3 cm³	20/6		10	30					XVI*
	1:10000	1:10000									

A Herzfrequenz vor Strophanthingabe in 1 min. B Strophanthindosis auf 10 g Frosch. C Atropindosis auf 10 g Frosch. D Vergiftungserscheinungen in Minuten nach der Strophanthingabe: 1. Frequenzverminderung nach .... min p. i.; 2. Herzperistaltik nach . .. min p. i.; 3. Irregularität nach .... min p. i.; 4. Herztod nach .... min p. i. E Vaguswirkungen: 5. Reizort; 6. Zeit in Minuten p. i.; 7. Frequenz vor der Reizung in .... min p. i.; 8. Dauer des Herzstillstandes in .... sec. nach 10 sec. Reiz. F Versuchsnummer.

Anmerkung. Die Frösche erhielten 0,2—0,25 cm³ Kurarin 1:1000 zur Ausschaltung störender Muskelzuckungen.

Einwirkung verabreicht, wo die Vagusreizung nur kurze Stillstände auslöste. Im letzten Falle verschwanden diese Vaguseffekte natürlich nach Zusatz der wirksamen Atropingabe (2 gtt 10^{-5} je 1 cm³). In den späteren Stadien der toxischen Digitalisbradykardie traten aber trotz dieser Atropinbehandlung die minutenlangen Vagusstillstände des Herzens wieder auf. Ein Auszug aus dem Versuchsprotokoll des Präparates Nr. 3 mag das Ergebnis von 12 gleichartigen Versuchen belegen.

* Bei Versuch XV und XVI narkotisierten wir mit 1,0 cm³ bzw. 0,75 cm³ einer 20%igen wäßrigen Urethanlösung. Wie in den vorhergegangenen Versuchen sahen wir auch hier unerwartet schnelles Absterben der Präparate nach der Strophanthingabe.

Versuch Nr. 3. Esculenta 45 g. Innerviertes Straub-Herz in situ. Reizdauer 10 sec. Vagusreiz in der Vorperiode mit größter Reizstärke (P.W. 16) ohne Erfolg (Sympathikusfrosch).

15^{05} Uhr: k-Strophanthin 1:300000.

15^{10} Uhr Vagusreiz mit größter Reizstärke (P.W. 16), angedeuteter Vaguseffekt. Dieser wird sofort von Sympathikuswirkung überlagert.

15^{15} Uhr: Vagusreiz, Herzstillstand 12 sec.

15^{17} Uhr: Beginn der Herzschädigung. Vagusreiz, Herzstillstand 12 sec.

15^{18} Uhr: Atropingabe 1:100000.

15^{20}—15^{25} Uhr: Vagusreiz ohne Erfolg. Reizstärke (P.W. 16).

15^{28} Uhr: Vagusreiz (P.W. 16) 168 sec. Herzstillstand.

Als Ergebnis aller dieser Versuche kann festgestellt werden: Im toxischen Bereich der Strophanthinwirkungen begann immer eine scheinbare Sensibilisierung aufzutreten in Gestalt der extrem langen Herzstillstände (bis 300 sec), wie auch schon von Boehm beobachtet wurde. In allen Fällen gingen dieser Wirkung andere Zeichen der Digitalisvergiftung (Irregularität, Peristaltik) voraus. Der Eintritt dieser sogenannten „Vagussensibilisierung" steht also in einem engen Zusammenhang mit der toxischen Bradykardie. Durch Atropinisierung ließen sich diese Vagusreaktionen nicht aufheben oder verhüten. Nur in den ersten Stadien hob Atropin die Vaguswirkung vorübergehend auf. Diese Versuchsergebnisse stimmen also mit denen in der 1. Versuchsreihe am suspendierten Froschherzen überein.

Bei den beschriebenen Versuchen wurde meist die Reizschwelle für den Vagusreiz auf der anfangs ermittelten Größe (just maximal) gehalten und die Sensibilisierung aus dem Auftreten der verlängerten Herzstillstände abgelesen. Es fiel aber schon früh auf, daß bei den „Sympathikusfröschen", deren Herzen auf höchste Vagusreize keinen Stillstand erkennen ließen, solche Reaktionen nach der Strophanthinbehandlung auftraten. Wir bemühten uns, nun auch unter Variation der Reizstärke diese anfängliche Sensibilisierung von Vaguseffekten aus Änderung der Reizschwelle zu beurteilen. Dies gelang tatsächlich schon in einem ersten Stadium, wo noch keine sicheren Vergiftungssymptome, insbesondere auch noch keine toxische Bradykardie eingetreten ist. Dabei wurden nur kurzfristige Stillstände erzielt, die niemals die Reizdauer wesentlich überschritten. Die Reizschwelle änderte sich dabei von P.W. 16—14 auf P.W. 6—8. In diesem Stadium war der Hemmungseffekt von nunmehr überschwellig gewordenen Reizen auch nicht länger anhaltend. Bei solchen stärkeren Reizen folgte sogar meist eine stärkere Akzeleransnachwirkung, so daß wohl anzunehmen ist, der stärker gereizte Akzelerans habe auch schon dem Vaguseffekt stärker entgegengewirkt. Leider lassen sich bei der Reizung am Vagusstamm des Frosches die beiden Nervenfasern nicht genügend trennen. Nach Erreichung einer solchen anfänglichen Erhöhung der Erregbarkeit unter Strophanthin blieb dieser Wert ohne Änderungen erhalten.

Es ergaben sich nun Zweifel, ob diese Änderung der Erregbarkeit im ersten therapeutischen Stadium der Strophanthinwirkung im Sinne einer echten Sensibilisierung für Vagusreize aufzufassen ist, zumal gelegentliche Kontrollen der Dorylempfindlichkeit in solchen Fällen keine parallele Zunahme der Herzhemmung durch dieses Parasympathikusgift ergaben. Wir prüften daher in 6 weiteren Versuchen bei bewußter Verlängerung des Vorstadiums unter häufigem Waschen und bei Kontrolle der Dorylempfindlichkeit das Verhalten der Herzen. Diese hatten in allen Fällen zunächst den Charakter von „Sympathikusfröschen" geboten und hatten auf höchste Vagusreize überhaupt nicht angesprochen. In den Vorstadien von etwa 15—30 min kam es nun auch ohne Strophanthinbehandlung bei allmählicher Abnahme der Kontraktionsleistung (Hypodynamie) zum Auftreten von Vagusreaktionen, so daß sogar auf Reizstärken von P.W. 8—10 statt P.W. 14—16 kurze Herzstillstände auftraten, ganz wie wir dies vorher für das Strophanthin beschrieben haben. Wenn nun in diesem Stadium therapeutische Strophanthinkonzentrationen von 1:1 Million und weniger, aber auch toxische Konzentrationen wie früher zur Einwirkung kamen, dann blieb bei deutlicher Verbesserung der Kontraktionsleistung die Reizschwelle zunächst unverändert. Sie stieg sogar meist wieder an oder es kam sogar zum Verschwinden der Vaguseffekte, bis erst in späteren Stadien der toxischen Dosierung wieder die beschriebenen extrem langen Vaguseffekte erkennbar wurden. Ein Versuchsprotokoll und Kurvenbild mag als Beispiel dienen.

Innerviertes Straub-Herz in situ. 10. 8. 48. Esculenta. Versuchsdauer über 5 Std.

9^{20} Uhr: Nach Vagusreiz (P.W. 16) kein Herzstillstand (Sympathikusfrosch), keine Akzeleranswirkung.

9^{22} Uhr: Doryl (1 gtt 10 ^{5}), Abnahme der Hubhöhe auf $^{1}/_{3}$. Nach Vagusreiz (P.W. 16) kein Herzstillstand, keine Akzeleranswirkung (vgl. Kurvenbild 1).

9^{32}—10 ^{8} Uhr: Hypodynamisierung durch häufiges Waschen mit Ringer.

9^{50} Uhr: Doryl (2 gtt 10 ^{6}), Abnahme der Hubhöhe auf 50%. Nach Vagusreiz (P.W. 16) kein Herzstillstand, keine Akzeleranswirkung.

10^{20} Uhr: Vagusreiz (P.W. 16): Akzeleranswirkung nach flüchtiger Hemmung.

10^{31} Uhr: Doryl (2 gtt 10 ^{6}). Nach Vagusreiz (P.W. 16) keine Hemmung, starke Abschwächung der Akzeleranswirkung (vgl. Kurvenbild 2).

11^{05} Uhr: Erstmalig Vagusstillstand nach Reizung mit P.W. 16*, gefolgt von starker Akzeleranswirkung (vgl. Kurvenbild 3).

In der weiteren Versuchszeit bis 12.34 Uhr verschob sich die Reizschwelle für den Vagus auf P.W. 8—12. Die Akzeleranswirkung trat dabei deutlich in Erscheinung.

12^{30} Uhr: k-Strophanthin 1:150000 2 gtt ($^{1}/_{}$ der tödlichen Konzentration).

* Mit der geringen Reizstärke trat eine sichere Hemmung ein, während gleichzeitig mit größter Reizstärke (P.W. 16) kein Stillstand erzielt wurde. Offenbar wurde bei dieser Reizstärke durch den Akzelerans die Vaguswirkung abgeschwächt.

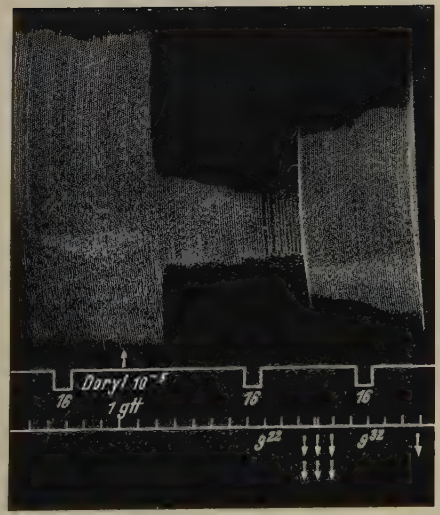


Abb. 1.

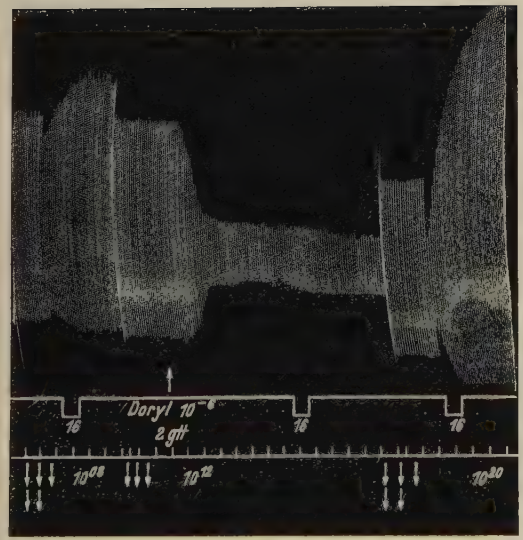


Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 1—3. Innerviertes Froschherz an der STRAUB-Kanüle in situ. Vagusreizung am Stamm. Reizdauer 10 sec; Zeitschreibung 10 sec. 1 Vorperiode, kein Vaguseffekt (Sympathikusfrosch). Grenzdosis für Doryl: 1 gtt. 10^{-5}. 2 und 3 Fortschreitende Hypodynamisierung durch Auswaschen. Vaguseffekt tritt auf, Reizschwelle sinkt, dabei verstärkte Akzeleranswirkung.

12^{33}—13^{25} Uhr: Unter fortschreitender Verbesserung der Herzleistung (therapeutisches Stadium) keine Sensibilisierung für den Vagus, aber Abnahme der Akzeleranswirkung nach der Reizung (vgl. Kurvenbild 4).

13^{11} Uhr: Doryl (2 gtt 10^{-6}) senkt die Hubhöhe auf etwa 50%, also keine Verstärkung der Wirkung! Unter der Reizung (P.W. 12—14) gar keine Akzeleranswirkung. Bei P.W. 16. Akzeleranswirkung wieder deutlich (vgl. Kurvenbild 5).

13^{2} Uhr: Akzeleranswirkung nach der Reizung (P.W. 14) nach der Entfernung des Doryls deutlich.

14^{03} Uhr: k-Strophanthin (1:30000 2 gtt). In der Folgezeit blieben Vagusreize vom Stamm aus unwirksam, möglicherweise weil der Nerv keine so lange Lebensdauer hatte. Im folgenden toxischen Strophanthinstadium erwies sich Sinusreiz noch schwach wirksam. Schließlich kam es nach Sinusreiz zum Herzstillstand von 170 sec Dauer.

In diesen Kurven ist besonders eindrucksvoll auch noch das Auftreten von Akzeleransreaktionen nach dem Vagusstillstand. Diese Erscheinungen waren besonders deutlich im Stadium der Hypodynamie und verschwanden wieder, wenn unter Digitalis die Hubhöhe auf normale Werte gebessert wurde. Im folgenden toxischen Stadium, wo die Hubhöhe wieder vermindert wurde, blieb nunmehr aber auch die Akzeleranswirkung aus, wenn gleichzeitig noch deutliche Vagusreaktionen vorlagen.

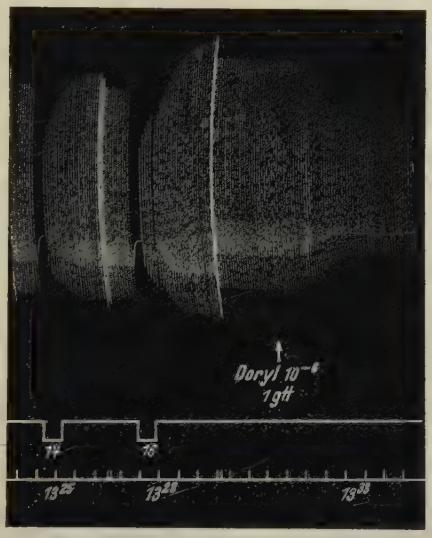


Abb. 4.

Ein Absterben des Akzelerans ist nach allgemeinen Erfahrungen erst später als für den Vagus zu befürchten. Diesen Beobachtungen soll weiter nachgegangen werden.

IV. Sensibilisierung für Vagusreizgifte.

Eine Sensibilisierung für Vagusreize müßte, da bei Erregung des Vagus als Überträgerstoff Azetylcholin freigesetzt wird, auch an einer verstärkten Reaktion des strophanthinvorbehandelten Froschherzens gegen diesen Stoff erkennbar werden. Beobachtungen dieser Art hat schon Gremels[10] bekanntgegeben. Unter Strophanthin 1:40 Millionen, also weit außerhalb der toxischen Konzentrationen, beschrieb er verstärkte Reaktionen auf Zusätze von Acetylcholin 1:20 Millionen, wenn diese Prüfungen bei wiederholten Gaben anscheinend ohne Ringer-Zwischenwaschungen vorgenommen wurden (Abb. 35 seiner Arbeit). Der Grad der Sensibilisierung ist aus diesen Angaben nicht zu berechnen,

Abb. 5.

Abb. 4—5. Fortsetzung des Versuchs von Abb. 1. Nach Strophanthin fortschreitende Verbesserung der Herzleistung. Keine Sensibilisierung für den Vagus, aber Abnahme der Akzeleransreaktion. Im späten Stadium ist auch die Dorylwirkung nicht verstärkt.

da nicht die Verschiebung der gleichwirksamen Grenzdosierung von Azetylcholin unter Strophanthin ermittelt wurde. Die Versuchsergebnisse sind daher nicht sehr überzeugend und entsprechen auch keinesfalls der Angabe in der gleichen Arbeit von GREMELS, daß z. B. bei Stoffwechselmessungen das Azetylcholin unter Strophanthin bis zu 1000mal stärker wirksam wird.

Wir haben uns zu wiederholten Malen (LENDLE, SCHLEYPEN[19] bemüht, auch am isolierten Froschherzen in verschiedenen Dosierungsbereichen mit Strophanthin und Digitoxin Sensibilisierungen für Vaguseffekte zu erreichen. Wir benutzten dazu die Ermittlung der am spontan schlagenden Herzen und am gereizten Ventrikelpräparat von Rana temporaria sicher hemmenden oder völlig lähmenden Konzentrationen von Azetylcholin und Doryl. Es gelang in keinem Fall durch Vorbehandlung mit Strophanthin in nicht toxischen Konzentrationen eine verstärkte Wirkung dieser

Vagusreizgifte zu erzielen, ebensowenig, wenn Strophanthin einem Herzen, welches unter Doryl oder Azetylcholin + Eserin einen gleichmäßigen Hemmungszustand erreicht hatte, nachträglich zugesetzt wurde. Die wirksame Dorylkonzentration lag bei 10^{-8}—10^{-7} und die von Azetylcholin um 10^{-9}. Die Wirkungsbedingungen waren am spontan schlagenden Herzen und am gereizten Ventrikelpräparat die gleichen.

Bei einigen Versuchen wurde anfänglich, um die Wirkungsdauer des Azetylcholins durch Ausschaltung der Esterase zu verlängern und gleichmäßiger zu halten, dem Azetylcholin noch Eserin zugesetzt. In diesen Fällen kam es zur Verstärkung der Azetylcholinwirkung bis auf das 10fache (Grenzkonzentration 10^{-10}). Da diese Wirkung des Eserins aber erst innerhalb von 30—60 min ihren Höhepunkt erreichte (vgl. entsprechende Erfahrungen von Genuit[26] am Warmblüterherzen), so ergab sich bei der laufenden Prüfung der Azetylcholinempfindlichkeit unter Strophanthin bei solchen Versuchen eine zunehmende Wirkung des Vagusstoffes. Wenn das Strophanthin aber erst nach abgeschlossener Eserinsensibilisierung zugesetzt wurde, war keine sichere Wirkungsverstärkung für Azetylcholin mehr festzustellen. Diese Beobachtung sei hier bekanntgegeben, weil solche Momente möglicherweise mitspielen, wenn andere Autoren vielleicht aus gleichen Erwägungen wie wir Azetylcholinversuche am eserinisierten Herzen anstellen. Gremels macht keine Angaben über derartige Versuchsbedingungen.

Auch ein weiterer Gesichtspunkt mag für das abweichende Verhalten unserer Ergebnisse von den Erfahrungen anderer Autoren eine Rolle spielen. Die Wirksamkeit von Azetylcholin oder Doryl steigt am isolierten Herzen bei längerem Auswaschen allmählich an*. Es ist begreiflich, daß an einem hypodynamen Herzen hemmende Vaguswirkungen auf die geringere Erregungslage der Automatie stärker zum Ausdruck kommen können. Es muß bei solchen Sensibilisierungsversuchen also die Empfindlichkeit sehr genau eingestellt und abgestuft geprüft werden.

Aus der neuen Literatur ist uns nur noch eine Arbeit von Mazella** bekanntgeworden, nach welcher Strophanthin am Herz- und Skeletmuskel von Amphibien sensibilisierend für Azetylcholin wirken soll. Der Autor gibt auch an, daß die Cholinesterase durch Strophanthin gehemmt werde. Wir haben auch Untersuchungen am isolierten Rektus von Esculenten ausgeführt. Azetylcholinkonzentrationen von 2×10^{-7} lösten bei diesem Präparat eine reversible Kontraktur aus. k-Strophanthin zeigte an diesem Muskel keine Eigenwirkung und verstärkte in Konzentrationen bis 1:100000 die Azetylcholinwirkung nicht. Es ergaben sich jedoch in dieser und in schwächeren Konzentrationen ausgesprochene Hemmungen in der Rückentwicklung der Kontraktur beim Auswaschen. Die Erholungszeit, die erforderlich war, betrug nun mehr als 30 min gegenüber 5 bis 10 min in der Norm. Daraus kann vielleicht auf gewisse Stoffwechselwirkungen solcher hohen Strophanthinkonzentrationen geschlossen werden.

* Vgl. dazu Voigt: Arch. exper. Path. **203**, 295 (1944).

** Ref. im Chem. Zbl. **1948 I**, 1338.

Abdon, Nielsen und Mitarbeiter[5] haben übrigens auch am Herzen eine Hemmung der enzymatischen Phosphorkreatinspaltung durch Strophanthin beobachtet und führten darauf eine verstärkte Azetylcholinwirkung zurück, während nach ihren Erfahrungen die Esterase durch das Strophanthin nicht beeinflußt wird.

V. Folgerungen aus den Ergebnissen.

In den vorausgegangenen Abschnitten ist es nicht gelungen, weder bei elektrischer Vagusreizung noch bei Einwirkung von Vagusreizgiften wie Doryl oder Azetylcholin, eine erhöhte Ansprechbarkeit durch Vorbehandlung mit Strophanthin oder Digitoxin zu begründen, und zwar am isolierten Froschherzen und am suspendierten Froschherzen in situ. Es gelang also nicht die heute vielfach so stark betonte „Sensibilisierung für Vaguseffekte durch Digitalis" zu bestätigen. Einleitend ist besonders auf die Bedeutung dieser Möglichkeit für die Erklärung von Digitaliswirkungen über den Stoffwechsel des Herzmuskels hingewiesen worden.

Die hier vorgelegten Befunde nach Versuchen am Froschherzen können zwar nicht direkt die Ergebnisse von Gremels[11] am Herz-Lungenpräparat des Warmblüters, dessen Stoffwechselinsuffizienz eine andere Beeinflussungsmöglichkeit bieten mag, widerlegen. Es konnten aber die von Gremels[10] am Froschherzen erhobenen Befunde einer Sensibilisierung für Azetylcholin nicht bestätigt werden. Vor allem gaben die älteren Beobachtungen von Boehm, die im Tatsächlichen bestätigt werden konnten, nach unseren kritischen Kontrollen keine Berechtigung, daraus eine entscheidende Sensibilisierung für Vagusreize durch *therapeutische* Digitalisgaben als spezifische Reaktion abzulesen. Boehm selbst hat sich in dieser Beziehung sehr vorsichtig ausgesprochen.

Auch W. Straub[8] sprach in seinem Handbuchbeitrag nur von einer „Zustandsänderung des Herzens" als Ursache der verstärkten Vaguseffekte. In einer neuen Arbeit erklärte er[27] die Bradykardie aber durch eine unter die Grundwirkungen der Digitalis gerechnete „Sensibilisierung des Herzmuskels gegen den regulierenden Vaguseinfluß". Diese Auffassung ist meist in die modernen monographischen Darstellungen übergegangen (vgl. Weese[1], Lendle[2]), während sich z. B. in der älteren Digitalismonographie von Magnus und Mitarbeitern[28] noch die Vorstellungen von einer zentralen Vaguswirkung erhielten. Auch in dem Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie von Meyer-Gottlieb in der Neubearbeitung von Pick[29] ist noch von verschiedenen Möglichkeiten einer Vaguswirksamkeit der Digitalis neben einer Sensibilisierung die Rede.

Es ist vielleicht besonders wichtig, festzustellen, daß in klinisch-pharmakologischen Arbeiten über Digitalis die Sensibilisierungstheorie nicht so eindeutig festgelegt ist wie in der modernen pharmakologischen Literatur. So hat z. B. Edens in seiner Digitalisfibel[3] diese Auffassung nicht vertreten und in seinem Standardwerk „Die Digitalisbehandlung"[30] spricht er von den besonderen klinischen Fällen, in welchen eine Digitalisbradykardie auftritt oder ausbleibt. Dabei spielt die übliche pharmakologische Deutung keine Rolle. Er vertritt hier (S. 12) seine eigene Hypothese, daß am insuffizienten Herzen mit schlechten Durchblutungsbedingungen auf Grund der Asphyxie schon ein Vagusreiz erfolgen könne, der addierend eine Digitaliswirkung verstärkte.

Auch in dem vorzüglichen Werk über klinische Pharmakologie von Goodman und Gilman[31] wird die Bedeutung der Bradykardie nach Digitalis eingeschränkt und als deren Ursache vorwiegend ein Angriff an den Carotissinus erörtert. Die beiden amerikanischen Autoren betrachten die Kompensierung des Herzens als Ursache der klinischen Bradykardie nach Digitalis und betonen, daß übrigens oft eine klinische Besserung auch ohne Bradykardie oder früher auftritt. Die Tachykardie wird sogar als eine kompensatorische Reaktion aufgefaßt, um zureichende Kreislaufverhältnisse zu erhalten (S. 506). Diese Beurteilung geht wohl entscheidend zurück auf Erfahrungen von Gold und Cattell u. a.[32]*. Sie beschrieben z. B., daß bei Vorhofflimmern mit Herzschwäche Digitalis in viel kleineren Dosen schon eine Pulsverlangsamung auslöst, als wenn Flimmern ohne Herzschwäche bestand. Es dürfte auch jedem Kliniker bekannt sein, daß Digitalis am Herzgesunden und bei thyreotoxischer Tachykardie keine Bradykardie, selbst in großen Dosen verursacht. Digitalis wirkt verlangsamend nur bei Arrhythmia absoluta, nicht bei paroxysmaler Tachykardie.

Edens[30] hat in seiner Digitalismonographie** die besonderen Bedingungen klar zusammengestellt, wo Digitalis keine Pulsverlangsamung auslöst. Es handelt sich um Herzen, bei denen nicht gleichzeitig Hypertrophie und Insuffizienz bestehen, d. h. also, wo Digitalis nicht primär kompensierend wirken kann und damit Stauung, erhöhten Venendruck und Bainbridge-Reflex als Ursachen der Tachykardie beseitigt. Edens betont ausdrücklich, daß die im Tierversuch völlig unwirksamen Digitalisdosen bei solchen herzkranken Menschen ohne Blutdrucksteigerungen Pulsverlangsamung bewirken.

Es wäre danach, also klinisch beurteilt, gar nicht entscheidend, die primäre Pulsverlangsamung, die durch Ökonomisierung die Herzleistung verbessert und durch Verlängerung der diastolischen Pause die Kontraktionsbedingungen begünstigt, sondern die Kompensation mit „Entstauung", welche einen Circulus vitiosus durchbricht, indem sie auch die Ursachen der Tachykardie aufhebt. Diese Auffassung steht wohl in Übereinstimmung mit neuen Vorstellungen von Meyer[33] über Herzinsuffizienz und Digitaliswirkung.

Es müßte nun noch gefragt werden, ob die Analyse der physiologischen Wirkungen extrakardialer Nerven auf die Herzleistung überhaupt eine Möglichkeit der Digitaliswirkung über den Vagus zu begründen vermag. Es scheint uns auch von dieser Seite keine Notwendigkeit solcher Deutung zu bestehen. Gewiß würde ein Vaguseffekt mit verlängerter Diastole sich günstig auswirken können, aber andererseits läßt der Vagus auf die Koronardurchblutung und Dynamik der Herzmuskelkontraktion keine günstige Wirkung erwarten.

Sulzer[34] hat bei Ermittlung der isometrischen und isotonischen Maxima am Froschherzen unter Strophanthin nur positiv inotrope Wirkungen beschrieben und lehnt demgemäß eine Vagusbeteiligung ab. Mirzojan (zit. nach Reichel) beschrieb am isolierten Schneckenherzen, welches keine nervösen Fasern und Ganglien besitzen soll, die gleichen therapeutischen Digitaliswirkungen über den Muskel. Reichel selbst[35] hat neuerdings mit Franks Methode der Registrierung der Muskeldynamik Vagus- und Sympathikuseffekte auf die „Herzkraft" studiert. Danach waren die Digitaliswirkungen alles andere als eine Vaguswirkung, welche nur die Leistungen am Herzen herabsetzte. In einer

* Internationaler physiol. Kongreß Zürich 1938, Bericht S. 183.
** 3. Aufl. 1948, S. 12.

späteren Arbeit[36] versuchte er jedoch neben der spezifischen Digitaliswirkung auch noch eine über den Vagus mögliche Beeinflussung zu bestätigen.

Wenn im vorausgehenden die Digitalisbradykardie, wie sie der Kliniker bei der Digitalisbehandlung beobachtet, nicht mehr über eine Sensibilisierung des Herzmuskels für den normalen Vagustonus erklärt wurde, so soll nun aber in der Frage der *toxischen Digitalisbradykardie*, wie sie dem Kliniker von der Digitaliskumulation her und im Tierversuch auch als Zeichen einer akuten Vergiftung bekannt ist, der Anteil des Vagus nicht bestritten werden. Hier kommt es bekanntlich ja auch nicht nur zur Wiederkehr der normalen Pulsfrequenz von der Tachykardie des insuffizienten Herzens her, sondern zu einer wirklichen Verlangsamung unterhalb der Norm auf 50–40 Schläge neben Irregularitäten, Blutdrucksenkung usw. Bei noch zunehmender Vergiftung tritt schließlich eine Tachykardie auf. In diesem Stadium pflegt die elektrische Vaguserregbarkeit aufgehoben zu sein. Es handelt sich hier aber doch wohl um keine echte Vaguslähmung, wie durch Atropin, sondern um eine „scheinbare Vaguslähmung" (vgl. S. 398f).

Es scheint uns auch bei der toxischen Digitalisbradykardie nicht möglich, zur Deutung auf die alten Ergebnisse von Boehm (trotz unserer Bestätigung des Tatsächlichen) zurückzugreifen. Am Froschherzen lagen so schwere toxische Störungen vor, daß selbst eine starke Atropinisierung die Bradykardie und die langen Herzstillstände nach Vagusreizung nicht hemmten, während die toxische Bradykardie am Warmblüter vom Atropin aufgehoben werden kann. Hier liegt also sicher eine Erhöhung des Vagustonus oder auch eine verstärkte Ansprechbarkeit des Herzmuskels vor.

Weiss[37] hat schon 1932 angenommen, daß diese toxische Bradykardie reflektorisch von den Eingeweiden aus über den Vagus ausgelöst wird. Wir möchten heute die Vermutung aussprechen, daß es sich bei der toxischen Digitalisbradykardie um eine Abart des Bezold-Jarisch-*Effektes* handelt, also einen Reflex, der von Reizstoffen in der Herzwand ausgelöst über den Vagus afferent und efferent verläuft. Diesen Reflex hat Jarisch und seine Schule[38], Schaefer[39] und zuletzt Göpfert[40] besonders deutlich am Veratrinkollaps beschrieben. Dort[39] findet sich auch der wichtige Hinweis darauf, daß solche Bradykardien auch bei klinischen Fällen von Angina pectoris und Herzinfarkt auftreten. Man wird sich in diesem Zusammenhang auch an die koronarverengernde Wirksamkeit toxischer Digitalisgaben erinnern dürfen.

Unsere Vermutungen fanden erst jüngst in einem Vortrag von Krayer[41] über diesen Reflexmechanismus des Veratrins eine weitere Stütze, als wir dort erfuhren, daß nach neuen amerikanischen Forschungen das Veratrin ein dem Solanin eng verwandter Stoff ist, ein Glykoalkaloid von Steroidnatur! Es wäre also wohl nicht ganz abwegig, anzunehmen, daß die nächstverwandten Digitalisglykoside, ähnlich wie Solanin und Veratrin, solche Reflexwirkungen vom Koronargefäßsystem aus auslösen können.

Zusammenfassung.

Die nach therapeutischen Gaben von Digitalis klinisch beobachtete Pulsverlangsamung ist nicht über eine direkte oder indirekte Vaguserregung zu deuten, sondern als Folge der verbesserten Kreislaufbedingungen (Entstauung).

Bei der im Tierversuch nachgewiesenen, von Atropin aufzuhebenden Digitalisbradykardie handelt es sich um eine toxische Erscheinung. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß diese Pulshemmung reflektorisch nach Art des Bezold-Jarisch-Reflexes zustande kommt.

Die in die Literatur eingegangene Auffassung, daß die Digitalisbradykardie die Folge einer Sensibilisierung des Herzmuskels für den normalen Vagustonus sei, wird experimentell nicht bestätigt. Die älteren Versuche von Boehm am Froschherzen in situ wurden als Beobachtung bestätigt, lassen sich aber nicht als Vaguseffekte deuten. Die nach Vagusreizung auftretenden extrem langen Stillstände am digitalisvergifteten Herzen sind durch Atropin weder zu verhüten noch aufzuheben. Auch am „innervierten Straub-Herzen in situ" war kein echter Sensibilisierungseffekt für den Vagus durch therapeutische Digitalisgaben nachzuweisen. Ferner wurden parasympathische Erregungsgifte wie Azetylcholin und Doryl durch Vorbehandlung der isolierten Herzen mit Strophanthin nicht verstärkt wirksam.

Eine therapeutisch bedeutsame Vaguswirkung der Digitalisglykoside als „Elementarwirkung" kann wohl nicht mehr angenommen werden.

Literatur.

[1] Weese, H.: Digitalis. Leipzig 1936. — [2] Lendle, L.: Heffter-Heubners Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Bd. I. 1935. — [3] Edens, E.: Digitalisfibel für den Arzt. Berlin 1938. — [4] Heymans, C., Bouckaert et Regniers: Arch. int. Pharmacodynam. **44**, 31 (1932). — [5] Abdon u. Nielsen: Skand. Arch. Physiol. (D.) **78**, 1 (1938). — [6] Marx, R.: Arch. exper. Path. (D.) **185**, 42 (1937). — [7] Veil u. Heilmeyer: Dtsch. Arch. klin. Med. **147**, 22 (1925). — [8] Straub, W.: Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II/2, S. 1419ff. 1924. — [9] Boehm, R.: Pflügers Arch. **5**, 153 (1872). — [10] Gremels, H.: Erg. Physiol. **42**, 95 (1939). — [11] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 397 (1935); **186**, 625 (1937). — [12] Matthes, K.: J. Physiol. (Brit.) **70**, 338 (1930). — [13] Kull, J.: Arch. exper. Path. (D.) **192**, 447 (1939). — [14] Zinnitz u. Rutz: Arch. exper. Path. **195**, 329 (1940). — [15] Genuit, H.: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 584 (1941). — [16] Lhotak v. Lhota: Arch. exper. Path. (D.) **58**, 350 (1908). — [17] Rothberger u. Winterberg: Pflügers Arch. **132**, 233 (1910); **150**, 217 (1913). — [18] Gerlach: Unveröffentlichte Versuche im Pharmakologischen Institut Münster. [19] Schleypen, W.: Verstärkung und Abschwächung pharmakologischer Vaguswirkungen am isolierten Froschherzen. Diss. Münster 1943. — [20] Bauereisen, E.: Z. Biol. **100**, 554 (1940/41). — [21] Langecker, H.: Arch. exper. Path. (D.) **106**, 1 (1925). — [22] Cori, K.: Arch. exper. Path. (D.) **91**, 130 (1921). — [23] Gaskell: J. Physiol. (Brit.) **7**, 49 (1888). — [24] Gellhorn: Zit. nach V. Brücke, Arch. exper. Path. (D.) **183**, 121 (1936). — [25] Hou, C. L., u. E. Th. Brücke: Pflügers Arch. **227**, 251 (1931). — [26] Genuit, H.: Arch. exper. Path. (D.) **198**, 561 (1941). —

[27] Straub, W.: Schweiz. med. Wschr. **1935**, 888. — [28] Magnus, R. u. Mitarb.: Die Digitalis und ihre therapeutische Anwendung. S. 617. Berlin 1923. — [29] Meyer-Gottlieb: Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie, S. 341. 1936. — [30] Edens: Die Digitalisbehandlung, 3. Aufl., S. 12ff. u. 1934, S. 9ff. — [31] Goodman, L., and Gilman: The pharmacol. Bases of Therap., S. 506. New York 1946. — [32] Gold u. Mitarb.: Proc. amer. Soc. Pharm. a. exper. Ther. **1938**. — Luten and Jeffreys: J. amer. med. Assoc. **197**, 2099 (1938). — [33] Meyer: Klin. Wschr. **1941**, 390. — [34] Sulzer: Z. Biol. **92**, 571 (1932). — [35] Reichel: Klin. Wschr. **1946**, 1. — Reichel u. Bauereisen: Klin. Wschr. **1947**, 785. — [36] Reichel: Z. Biol. **99**, 590 (1939). — [37] Weiss: Med. Clin. N. Amer. **15**, 963 (1932). Zit. nach Weese, S. 200. — [38] Jarisch u. Mitarb.: Arch. exper. Path. (D.) **187**, 706 (1937); **193**, 347, 355 (1939). — Amann u. Schaefer: Pflügers Arch. **246**, 757 (1943). — [39] Schaefer: Z. inn. Med. **1947**, 449. — [40] Göpfert, H.: Pflügers Arch. **249**, 230 (1947). — [41] Krayer: Vorträge amerikanischer Forscher im Auftrag der Uniterian Service. Berlin 1948.

Dr. F. Hohensee,
Pharmakologisches Institut der Universität Leipzig,

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 409—417 (1949).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Die Glykogenablagerung in Leber, Muskel und Fettgewebe hungernder Ratten nach Glukosefütterung.

Von

Franz X. Hausberger und Günter Glabasnia.

(Eingegangen am 10. November 1948.)

Als „Hungerdiabetes" bezeichnet man seit den Untersuchungen von Hoffmeister[1] ein diabetesähnliches Verhalten im Kohlenhydratstoffwechsel, dessen Ausmaß weitgehend abhängig ist von der Dauer des Nahrungsentzuges.

Bei Mensch und Tier kann es nach einer vorausgegangenen Hungerperiode nach Zufuhr von Kohlenhydraten zu einem erheblichen Blutzuckeranstieg und zu einer Glukosurie kommen[1–10]. Eine Reihe von Untersuchungen deuten darauf hin, daß diese herabgesetzte Kohlenhydrattoleranz nicht durch die verminderte Speicherungsfähigkeit der Leber bedingt ist, wie Soskin und Mitarbeiter[11] annehmen, zumindest nicht ausschließlich, sondern daß sowohl die Oxydation wie auch die Umwandlung der Glukose in Fett vermindert sind. So fanden Dann und Chambers[8] bei Hunden, die 19—31 Tage gehungert hatten, nur einen geringen Anstieg des Sauerstoffverbrauches. Erst nach 5tägiger Zufuhr von täglich 50 g Glukose entsprach er dem Wert bei den Kontrolltieren. Insulin in großen Dosen (2—6 E/kg) führte nur zu einer teilweisen Aufhebung dieses Hungereffektes. Der Sauerstoffverbrauch stieg nur etwas mehr als nach der alleinigen Zuckergabe, ließ also die gewohnte Wirkung weitgehend vermissen. Ein gleiches Verhalten zeigte auch der respiratorische Quotient, er erreichte unter keiner der Versuchsbedingungen die Höhe der Kontrollen. Über ein gleiches oder ähnliches Verhalten des R.Q. nach Kohlenhydratzufuhr im Hungerzustand berichten auch andere Autoren[6, 12–14].

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht festzustellen, ob mit zunehmendem Hunger die Speicherfähigkeit der Leber und der übrigen Gewebe geringer wird. Wir untersuchten zu diesem Zweck die Glykogenablagerung aus Nahrungsglukose nach verschieden langer Hungerzeit.

Methodik.

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten benutzt, denen verschieden lange Zeit die Nahrung völlig entzogen worden war. Für jede Hungerperiode wurden 3—4 Tiere verarbeitet. Die Gewichtsabnahme,

Tabelle 1. *Glykogen in Prozent*

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Hungerdauer	Ausgangsgewicht des Tieres g	Gewichtsverlust %	Leber		
					Ausgangswert	Endwert	Zu- oder Abnahme %
A	1	12 Std	254	1,6	0,98	2,31	+ 135,7
	2		191	2,1	0,92	0,67	27,2
	3		262	3,4	1,84	1,16	37,0
	4		161	3,7	1,76	1,29	26,7
		Durchschnittswert:		2,7	1,4	1,4	± 0
B	5	3 Tage	156	5,1	2,17	1,04	— 52,1
	6		233	14,6	1,07	1,21	+ 13,1
	7		241	21,7	0,15	1,5	+ 900,0
		Durchschnittswert:		13,7	1,13	1,25	+ 10,6
C	8	6 Tage	222	19,8	0,76	3,04	+ 300,0
	9		208	20,7	0,41	1,92	+ 368,0
	10		215	21,9	1,45	1,40	— 3,5
	11		200	25,5	0,38	1,49	+ 292,1
		Durchschnittswert:		22,0	0,75	1,96	+ 161,3
D	12	7 Tage	227	13,2	0,11	2,52	+2190,9
	13		196	18,9	0,76	1,90	+ 150,0
	14		176	21,0	0,56	0,90	+ 60,7
	15		198	22,7	0,40	1,49	+ 275,5
		Durchschnittswert:		19,0	0,46	1,70	+ 269,6
E	16	8 Tage	295	18,3	0,70	1,29	+ 84,3
	17		362	20,4	1,0	2,77	+ 177,0
	18		253	24,5	0,53	0,85	+ 60,4
		Durchschnittswert:		21,1	0,74	1,64	+ 121,6

+ mäßig abgemagert, ++ stark abgemagert, +++ stärker abgemagert,

die in den Tabellen in Prozenten angegeben ist, entsprach nicht immer dem Ernährungszustand beim Versuchsende, dieser ist daher noch besonders angegeben. Die Ernährungsbedingungen waren die gleichen wie in einer vorhergehende beschriebenen Untersuchung[15], also nicht maximal. Die schwankenden Glykogenwerte mögen zum Teil dadurch bedingt sein. In der Versuchsreihe Tabelle 1 wurde in tiefer Urethan-Äthernarkose (0,5 g Urethan/kg 1—2 Std vor der Operation) ein kleines Gewebsstückchen aus dem rechten lateralen Quadriceps, dann aus dem linken Hodenfettkörper und dem vorderen rechten Leberrand entnommen. Das Gewicht dieser Probeexzisionen war gewöhnlich 20—50 mg, bei den stark ausgehungerten Tieren das des Fettgewebes manchmal nur 10—12 mg. Wichtig ist, daß vor oder bei der Narkose kein Exzitationsstadium auftritt; es kommt dabei immer zu einer erheblichen Verminderung des Leberglykogens infolge der Adrenalinausschüttung, eine Auswertung solcher Versuche ist nicht möglich. Im

des Frischgewichtes.

Muskel			Fettgewebe			Ernährungszustand
Ausgangswert	Endwert	Zu- oder Abnahme %	Ausgangswert	Endwert	Zu- oder Abnahme %	
0,20	0,43	+ 115,0	0,05	0,14	+ 180,0	
0,25	0,37	+ 48,0	0,04	0,18	+ 350,0	
0,41	0,46	+ 12,2	0,04	0,09	+ 125,0	
0,57	0,37	- 35,1	0,24	0,21	— 12,5	
0,36	0,41	+ 13,9	0,09	0,16	+ 55,6	
0,49	0,38	— 22,4	0,04	0,05	+ 25,0	(+)
0,68	0,66	- 2,9	0,17	0,02	— 88,2	+++
0,43	0,16	- 62,8	0,19	0,17	10,5	+
0,53	0,40	— 24,5	0,13	0,08	— 38,5	
0,46	0,50	+ 8,7	0,12	0,05	— 58,3	+
0,44	0,49	+ 11,3	0,06	0,03	50,0	+
0,56	0,43	- 23,2	0,18	0,06	— 66,7	++
0,15	0,33	+ 120,0	0,88	0,41	- 53,4	+++
0,40	0,44	+ 10,0	0,31	0,14	— 54,8	
0,58	0,35	— 39,7	0,07	0,02	— 71,4	++
0,64	0,34	— 46,8	0,18	0,16	— 11,1	+++
0,51	0,25	- 51,0	0,49	0,23	— 53,1	++++
—	—	—	0,14	0,10	— 28,6	+
0,58	0,31	— 46,6	0,22	0,13	— 40,9	
0,11	0,24	+ 118,1	0,05	0,16	+ 220,0	++
0,20	0,34	+ 70,0	0,02	0,14	+ 600,0	++
0,21	0,40	+ 90,5	0,03	0,10	+ 233,3	+
0,17	0,33	+ 94,1	0,03	0,13	+ 333,3	

++++ sehr stark abgemagert.

Anschluß an die Operation, deren Dauer sich einschließlich der Nähte auf 10—12 min belief, wurde mit der Schlundsonde 50%ige Glukoselösung 10 cm³/kg gegeben. Zwei Std später wurde nochmals Zucker in der gleichen Menge verabreicht, außerdem physiologische Kochsalzlösung 20 cm³/kg und 0,25 g Urethan/kg. Nach weiteren 4 Std, also 6 Std nach der ersten Zuckergabe, wurde aus der anderen Seite bzw. aus der Leber möglichst entfernt von der ersten Exzisionsstelle, wieder in zusätzlicher tiefer Äthernarkose ein Stückchen in der gleichen Reihenfolge entnommen. Die Glykogenbestimmung erfolgte nach Somogyi und Mitarbeiter[16], die Glukosebestimmung im Hydrolysat nach Hagedorn-Jensen. Die in den Tabellen angegebenen Glykogenwerte sind Glukoseäquivalente. Bei den in Tabelle 2 untersuchten Tieren wurde vor der Fütterung keine Probeexzision vorgenommen, 2 Std vorher war, und zwar nur einmal, 1 g/kg Urethan gegeben worden.

Ergebnisse.

Die von uns bei den Tieren vor der Fütterung in der *Leber* gefundenen Glykogenwerte waren wesentlich ungleichmäßiger als die von Wetzel und Mitarbeitern[17] angegebenen. Diese Autoren fanden z. B. nach 3 Tagen Hunger einen Durchschnittswert von 0,88% bei einem Minimum von 0,76 und einem Maximum von 0,96%, nach 2 Tagen 0,77% bzw. 0,57 und 0,99%. Von Reindollar[18] dagegen wird ein Glykogengehalt von 0,14% (0,03—0,44%) angegeben, wenn die Tiere durch Dekapitieren nach 48stündigem Hunger getötet wurden. Wurde das Gewebe in Evipannarkose entnommen, so waren die entsprechenden Werte 0,23 bzw. 0,03—0,60%. Über ähnliche große Schwankungen berichten die meisten Untersucher. Nach unseren Untersuchungen beträgt der Glykogengehalt nach 6 Std Hunger im Mittel 2,42% (1,35—3,24%, Tabelle 2A), nach 12 Std 1,4% (0,92—1,84%, Tabelle 1A). Im Verlauf des Hungers nimmt das Leberglykogen weiter ab bis auf 0,46% (0,11—0,76%), ohne daß eine strenge Beziehung zur Hungerdauer oder zum Ernährungszustand besteht, soweit eine solche Annahme bei der relativ geringen Zahl der Tiere gestattet ist. Die etwas höheren Werte am 8. Hungertag (Tabelle 1 E) gegenüber denen am 7. (Tabelle 1 D) sind jedoch wahrscheinlich dadurch bedingt, daß in dieser Serie besonders kräftige Tiere verwendet wurden, die trotz des großen Gewichtsverlustes sich noch in einem relativ guten Ernährungszustand befanden.

Nach der Fütterung mit Glukose war bei den nur 6 Std hungernden Tieren das Leberglykogen praktisch unverändert (Tabelle 2 A:2B). Nach 3 Tagen Hunger dagegen ist der Mittelwert sowohl wie auch der Wert bei jedem der einzelnen Tiere ein deutlich höherer. Da nach dieser Hungerzeit der Glykogengehalt bestimmt wesentlich niedriger war — nach Tabelle 1B ergibt sich ein Durchschnittswert von 1,13% —, spricht der nach der Fütterung gefundene von 3,39% doch sehr für eine Glykogenzunahme (Tabelle 2C:1B). Auch aus jener Versuchsreihe, bei der die individuellen Glykogenwerte verglichen werden können (Tabelle 1), geht hervor, daß mit zunehmender Hungerdauer die Speicherfähigkeit keineswegs abnimmt. Trotz der großen Schwankungsbreite ist die Zunahme besonders dort eindeutig, wo die Ausgangswerte niedrig waren, und gewöhnlich ist sie um so ausgeprägter, je niedriger der Anfangswert war. Dort, wo bei der ersten Operation bereits ein relativ hoher Glykogengehalt gefunden worden war, kam es fast immer zu einer Abnahme (z. B. Nr. 5 und 10). Möglicherweise hat die Probeexzision auf die glykogenreiche Leber so stark glykogenolytisch gewirkt, daß der durch die Zuckergabe ausgeübte Reiz für eine Speicherung nicht ausreichte. Es ist aber für diese Beobachtung auch eine andere Erklärung möglich, nämlich daß die Kohlenhydratzufuhr zu einem bestimmten Zeitpunkt glykogenolytisch wirkt. Untersuchungen von

Tabelle 2.

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Hungerdauer	Ausgangsgewicht des Tieres g	Gewichtsverlust %	Glykogen in Prozent des Frischgewichtes Leber	Muskel	Fett	Ernährungszustand
A	19	6 Std	100		3,17	0,93	0,23	
	20		110		1,90	0,51	0,36	
	21		103		3,24	0,77	0,51	
	22		106		1,35	0,73	0,40	
		Durchschnittswert:			2,42	0,74	0,38	
B	23	6 Std	100		2,07	0,16	0,03	
	24	mit Zucker-	129		2,16	0,40	0,05	
	25	belastung	139		2,57	0,36	0,01	
	26		118		2,19	0,11	0,06	
		Durchschnittswert:			2,25	0,26	0,04	
C	27	3 Tage	113	22,1	3,73	0,65	0,24	++
	28	mit Zucker-	106	17,9	2,93	0,64	0,04	+
	29	belastung	113	17,7	3,29	0,41	0,28	+
	30		119	18,5	3,62	0,48	0,13	+
		Durchschnittswert:		19,1	3,39	0,55	0,17	

\+ stark abgemagert, ++ stärker abgemagert.

Bürger[19] und andere Beobachtungen, auf die Hausberger[20] hingewiesen hat, sprechen dafür.

In der *Muskulatur* war der Glykogengehalt im Hunger ebenfalls sehr viel schwankender (Tabelle 1 und 2) als von Wetzel und Mitarbeitern[17] angegeben. Bestimmte Beziehungen zwischen Hungerdauer oder Ernährungszustand waren nicht zu ermitteln. Nach der Fütterung kam es gewöhnlich dort, wo die Ausgangswerte sehr niedrig waren, zu einer Zunahme (Nr. 1, 11, 16, 17, 18), bei einem von Anfang an hohen Glykogengehalt war häufig eine Verminderung festzustellen (Nr. 4, 5, 7, 12—15, 23—26). Der Grenzwert liegt nach Tabelle 1 bei 0,46%. Bei der großen individuellen Schwankungsbreite kann aus den Werten jedoch sicher entnommen werden, daß mit zunehmender Hungerdauer oder Abmagerung kein Verlust der Speicherfähigkeit erfolgt.

Die am *Fettgewebe* erhaltenen Glykogenwerte zeigen ebenfalls die aus der Literatur bekannten großen Schwankungen (17, 21, 22). Auch hier fällt wieder auf, daß dort, wo die Ausgangswerte bei der Probeexzision niedrig waren, gewöhnlich eine Zunahme stattfand (Nr. 1—3, 5, 16—18, 23—26, mit Ausnahme von Nr. 12), dort, wo sie hoch waren eine Abnahme, wenn Glukose verabreicht worden war. Eine Verminderung der Glykogenspeicherung in Abhängigkeit von der Hungerdauer kann sicher ausgeschlossen werden, besonders nach den Ergebnissen der Tabelle 2 (B:C), bei der die gleichmäßigeren Werte für alle Gewebe möglicherweise durch das jüngere Tiermaterial bedingt sind.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den Versuchsergebnissen geht eindeutig hervor, daß im Hunger die Synthese- und Speicherfähigkeit der Leber, der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes für Glykogen nicht vermindert sind. Es kann also nicht deren von Soskin vermutete Hemmung durch den Hungerzustand die Ursache für die verminderte Zuckertoleranz sein. Die in der Einleitung besprochenen Veränderungen im Gasstoffwechsel zwingen in Verbindung mit unseren Ergebnissen zu dem Schluß, daß die Ursache in einer gestörten Fähigkeit der Gewebe zur Zuckeroxydation und Fettneubildung zu suchen ist. Welch große Rolle letztere gegenüber der Glykogensynthese spielt, haben erst die Untersuchungen von Stetten und Boxer[23] mit Deuterium gezeigt. Bei einer kohlenhydratreichen Kost verwerten Ratten innerhalb von 24 Std von den verfütterten Glukoseäquivalenten nur 3% zur Glykogenbildung, dagegen 30% zur Fettsynthese, der Rest wird verbrannt. Oxydation und Fettsynthese sind bei völligem Nahrungsentzug zunächst gestört, nicht aber die Glykogenese.

Nicht vereinbar mit den hier mitgeteilten Befunden scheinen frühere Untersuchungsergebnisse von Hausberger und Jachzorowycz[15] zu sein, die am überlebenden Zwerchfell und Fettgewebe von Ratten in Glukose-Phosphatpuffer-Ringerlösung die Glykogenbildung untersuchten. Sie war nur im Gewebe der Tiere zu beobachten, die normal ernährt worden oder nach einer Hungerperiode 24 Std mit Kohlenhydraten gefüttert worden waren, nicht aber wenn das Gewebe hungernden Tieren entnommen worden war. Um diesen Widerspruch zu erklären, ist es notwendig, kurz darauf hinzuweisen, daß zwischen Hungerzustand und Diabetes enge Beziehungen bestehen.

Sie gleichen sich in ihren Stoffwechselveränderungen weitgehend. Auch im Hunger ist der Kohlenhydratumsatz zugunsten der Fettverbrennung zurückgedrängt, die unter Umständen bis 90% des Energiebedarfes decken kann[13]. Nach Drury[24] werden bei Hunden und Kaninchen am 4. Hungertag nur mehr 10% der Oxydationen aus Glukose bestritten. Ebenso wie der R.Q. von Hungertieren (s. Einleitung) bewegt sich auch der von Diabetikern um den Wert der Fettverbrennung, er steigt ebenfalls nach Glukosezufuhr nicht an[25]. Nach einigen Hungertagen können beim Menschen die Blutketonkörper ebenso zunehmen wie beim schweren Diabetes[26]. Die Insulinsekretion, die vom Bedarf abhängt[27], ist im Hunger hochgradig vermindert oder fehlt ganz, wie aus den Untersuchungen von Foglia[28] hervorgeht. Überträgt man das Pankreas von längere Zeit hungernden Hunden auf einen diabetischen Empfänger, so bewirkt es nur einen geringen oder keinen Blutzuckerabfall. Die Untersuchungen mit Isotopen — Hausberger[20] hat darüber ausführlicher berichtet — haben gezeigt, daß als Ursache

der Hyperglykämie eine Zuckerneubildung aus Fett höchst unwahrscheinlich ist und die Blutzuckersteigerung beim Diabetes durch die verminderte Glukoseverwertung vor allem bedingt ist. Kürzlich konnten Crandall und Lipscomb[29] durch direkte Messung der Zuckerproduktion der diabetischen Leber mittels der Angiostomietechnik nach London beweisen, daß eine Glukoneogenese beim Diabetes keine Rolle spielt. Die Störung der Zuckerverwertung besteht darin, daß trotz des hohen Angebotes die Glukose nicht genügend verbrannt und in Fett umgewandelt werden kann. Dieser Schluß wurde schon frühzeitig von den Vertretern der Minderverwertungstheorie aus dem bekannten Verhalten des R.Q. gezogen und nachdem die Richtigkeit dieser Anschauung heute erwiesen ist, erscheint es auch gerechtfertigt, aus dem angeführten Gasstoffwechsel im Hunger anzunehmen, daß auch hier die gleiche Störung vorliegt.

Dieser diabetesähnliche Zustand ist sicher nicht nur auf die verminderte oder fehlende Insulinsekretion zurückzuführen. Darauf weist vor allem die Insulinresistenz der Hungertiere hin. Eine Reihe von Beobachtungen lassen vermuten, daß sowohl beim Diabetes wie auch im Hunger eine Überproduktion der Hypophyse bzw. ihrer insulinantagonistischen Hormone vorliegt. Hypophysenextrakte hemmen bei unversehrten Tieren die Insulinwirkung[30], ebenso bei entleberten[31] oder eviszerierten[32]. Die im Muskelgewebe in Glukoselösung auftretende Glykogenzunahme erfolgt nur in geringem Umfang, wenn die Muskulatur von diabetischen Tieren stammt[32a] und ebenfalls, wenn man den Versuchstieren 24 Std vor der Präparation Hypophysenextrakt verabreicht[34]. Dem Arbeitskreis um Cori[35] ist es gelungen zu zeigen, daß dieses insulinantagonistische Verhalten der Hypophyse auf einer Beeinflussung der Hexokinasereaktion beruht. Ein Überwiegen der Hypophyse hemmt den ersten Schritt des Glukoseabbaues, die Umwandlung der Glukose in Glukose-6-Phosphat und damit jede weitere Verwertung. Insulin hebt diese Hemmung auf. Damit ist heute erklärlich, warum beim pankreasdiabetischen Tier nach einer zusätzlichen Hypophysektomie sich die Glukosurie bessert und der Sauerstoffverbrauch und der R.Q. nach Kohlenhydratzufuhr wieder über den Wert der Fettverbrennung ansteigen. Daß im Hunger die Hypophyse vermehrt Hormon abgibt, konnten Weil und Stetten zeigen[36]. In der Hypophyse kommt nach Best und Campell[37] eine „adipokinetische" Substanz vor, die wahrscheinlich mit dem „Fettstoffwechselhormon" von Anselmino und Hoffmann[38] identisch ist. Seine Injektion führt bei der Hungermaus zu der Bildung einer Fettleber. Dieser Wirkstoff ließ sich aus dem Harn diabetischer und hungernder Tiere mit der gleichen Methode gewinnen wie aus der Hypophyse, so daß seine Identität wahrscheinlich ist.

In der Literatur findet sich nun eine Mitteilung, die den Widerspruch zwischen den in dieser Arbeit mitgeteilten Befunden über die Glykogenbildung von Hungertieren in vivo und den früher erhobenen gegenteiligen Beobachtungen in vitro zu erklären erlaubt. Shorr und Mitarbeiter[33] beobachteten, daß das Herzmuskelgewebe diabetischer Hunde die Fähigkeit Glukose zu oxydieren wiedergewinnt, wenn es einige Zeit mit Glukose-Phosphatlösung ausgewaschen worden war. Diese Feststellung wird von den Autoren auf die Ausschwemmung von Hemmstoffen zurückgeführt, die nach unseren heutigen Kenntnissen sicher hypophysärer Natur sind. Wir nehmen nun an, daß die gleichen Hemmstoffe bei den Versuchen am überlebenden Gewebe mit in die Suspensionsflüssigkeit übertragen wurden, die im unversehrten Organismus innerhalb unserer Versuchszeit unwirksam gemacht wurden.

Zusammenfassung.

An Ratten, die 6 Std bis 8 Tage gehungert hatten, wurde untersucht, ob mit zunehmender Hungerdauer die Fähigkeit zur Glykogenablagerung in der Leber, der Skeletmuskulatur und im Fettgewebe nach oraler Glukosegabe sich vermindert. Eine Wirkung des Hungers auf die Glykogenspeicherung konnte nicht festgestellt werden. Der Grund der Hemmung der Glykogenbildung bei früheren Versuchen in vitro wird in der Anwesenheit von hemmenden hypophysären Wirkstoffen — entsprechend beim Diabetes — angenommen, die bei der Fütterung im lebenden Tier in kurzer Zeit unwirksam werden, dagegen bei den Versuchen in vitro ihre Wirkung weiter entfalten.

Literatur.

[1] Hoffmeister: Arch. exper. Path. (D.) **26**, 355 (1890). — [2] Claude, Bernard: Lecons sur le diabète usw. Paris 1877. — [3] Bang: Der Blutzucker. Wiesbaden 1913. — [4] Staub: Z. klin. Med. **93**, 89 (1922). — [5] Vignard and Karr: J. biol. Chem. (Am.) **66**, 281 (1925). — [6] Goldblatt: Biochem. J. (Brit.) **19**, 948 (1925). — [7] Hines, Boyd and Leese: Amer. J. Physiol. **88**, 240 (1929). — [8] Dann and Chambers: J. biol. Chem. (Am.) **89**, 675 (1930). — [9] Sweeney, Tunnell and Tunnell: Amer. J. clin. Path. **14**, 437 (1944). — [10] Winter: Amer. J. Physiol. **147**, 228 (1946). — [11] Soskin and Mirsky: Amer. J. Physiol. **114**, 106 (1935). — Soskin u. Levine: Carbohydrate Metabolism. Chicago 1946. — [12] Johansson: Skand. Arch. Physiol. (D.) **21**, 1 (1909). — [13] Benedict: Carnegie Publ. **1915**, No 203, 328, 334. — [14] Johnston, Sheldon and Newburgh: J. Nutrit. (Am.) **17**, 213 (1940). — [15] Hausberger u. Jachtorowycz: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck). — [16] Good, Kramer and Somogyi: J. biol. Chem. (Am.) **100**, 485 (1933). — [17] Wetzel, Wollschitt, Ruska u. Oestreicher: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 703 (1936). — [18] Reindollar: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **33**, 182 (1935). — [19] Bürger u. Klotzbücher: Z. inn. Med. **1947**, 43. — Bürger: Z. inn. Med. **1947**, 311. — [20] Hausberger: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 267. — [21] Scoc: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **5**, 1 (1930). — Arch. Sci. biol. (It.) **17**, 236 (1932). — [22] Wetzel, Wollschitt, Ruska u. Oestreicher: Arch. exper. Path. (D.) **179**,

86 (1935). — [23] Stetten and Boxer: J. biol. Chem. (Am.) **155**, 231 (1944). — [24] Drury: J. clin. Endocrinol. **2**, 421 (1942). — [25] Root and Chrpenter: Amer. J. med. Sci. **206**, 234 (1943). — [26] Heinsen u. Osterwald: Z. exper. Med. **101**, 211 (1937). — [27] Haist: Physiol. Rev. (Am.) **24**, 409 (1944). — [28] Foglia: C. r. Soc. Biol. **127**, 409 (1938). — [29] Crandall and Lipscomb: Amer. J. Physiol. **148**, 312 (1947). — [30] Young: Brit. med. J. **1944**, 715. — [31] Himsworth and Scott: J. Physiol. (Brit.) **92**, 183 (1938). — [32] Bennett and Roberts: Amer. J. Physiol. **146**, 502 (1946). — [32a] Krahl and Cori: J. of. biol. Chem. **170**, 55 (1947). — [33] Shorr, Barker, Cohen and Malam: Amer. J. Physiol. **129**, 463 (1940). — [34] Nilson: Austral. J. exper. Biol. a. med. Sci. **22**, 131 (1944). — [35] Cori: Harvey Lect. (Am.) **41**, 253 (1944). Siehe auch Hausberger: Ärztl. Forsch. **2**, 204 (1948). — [36] Weil and Stetten: J. biol. Chem. (Am.) **168**, 129 (1947). — [37] Best and Campell: J. Physiol. (Brit.) **86**, 190 (1936). — Endocrinology (Am.) **23**, 692 (1938). — [38] Anselmino u. Hoffmann: Klin. Wschr. **1931**, 2380; **1934**, 1052.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 418—425 (1949).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Der Einfluß des Hungers und des Insulinmangels auf den Lipasegehalt der Skeletmuskulatur und des Fettgewebes von Ratten.

Von

Franz X. Hausberger und Hans-Robert Bublitz.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. November 1948.)

Durch die Forschungsergebnisse des Arbeitskreises um die beiden Cori ist bewiesen, daß Insulinmangel gleichbedeutend ist mit einer Verminderung der Zuckerverwertung, d. h. mit einer herabgesetzten Zuckeroxydation und Umwandlung der Kohlenhydrate in Fett. Das Inselhormon fördert die Phosphorylierung der Glukose in Glukose-6-phosphat und damit alle weiteren Schritte des Zuckerab- und -umbaues. sein Mangel führt zu einem Überwiegen der hemmenden Einflüsse der Hypophyse und Nebennieren[1]. Dort wo dem Organismus nicht genügend Glukose als Brennmaterial zur Verfügung steht, wie etwa im Hunger oder beim Diabetes, bei dem der im Überfluß vorhandene Zucker nicht genügend verwertet werden kann, werden besonders auch die Fettreserven zur Verbrennung herangezogen. Die vorherige Umwandlung der Fettsäuren in Glukose ist unwahrscheinlich, wie die biochemischen Untersuchungen mit Hilfe der Isotopen ergeben haben[2]. Die Oxydation des Fettes erfolgt in den extrahepatischen Geweben wahrscheinlich zum größten Teil erst nach dessen Abbau zu Ketonkörpern in der Leber. Im Hunger können so 30—80% des Energiebedarfes aus den Azetonkörpern bestritten werden[3], unter extremen experimentellen Bedingungen sogar über 90%[4]. Wahrscheinlich kann Fett aber auch direkt von den Geweben verbrannt werden[5].

Eine solch unmittelbare Oxydation ist an das Vorhandensein von fettspaltenden Fermentsystemen gebunden. Neutralfette oder andere fettsäurehaltigen Verbindungen müssen erst durch Lipasen gespalten, die Fettsäuren durch weitere spezifische Dehydrasen in kleinere Verbindungen zerlegt, die schließlich zu Wasser und Kohlensäure oxydiert werden. Solche Enzyme sind, soweit bisher untersucht, in fast allen Geweben nachgewiesen worden[6], mit Ausnahme des Gehirns[7]. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da er als Bestätigung dafür betrachtet werden kann, daß dieses Organ unter allen Umständen auf den Blutzucker als Brennmaterial angewiesen ist[8]. Direkte Beweise,

daß die Gewebe auch Neutralfette oxydieren können, fehlen, für Fettsäuren ist jedoch dieses Vermögen als gesichert anzunehmen. Die erhebliche Zunahme des Sauerstoffverbrauches bei intravenöser Zufuhr von Essigsäure, Buttersäure und anderen Fettsäuren auch bei eviszerierten Tieren kann kaum anders erklärt werden[9]. Da nun fast alle Gewebe auch eine Neutralfett spaltende Lipase enthalten, darf zunächst angenommen werden, daß sie die daraus entstehenden Fettsäuren auch weiter verwerten können.

Es erschien nun möglich, daß die Verminderung der Glukoseoxydation beim Diabetes und ebenso im Hunger[10] zu einer Zunahme des Fettabbaues in den extrahepatischen Geweben führen würde. Diese hätte weiter wahrscheinlich auch eine Vermehrung der lipolytischen gewebseigenen Fermente zur Folge. Von dieser Fragestellung aus haben wir im folgenden den Lipasegehalt im Muskel- und Fettgewebsextrakt hungernder und diabetischer Ratten untersucht.

Experimenteller Teil.

Verwendet wurden erwachsene männliche und weibliche Ratten, die mit einer vorwiegend aus Küchenabfällen, Brot und Hafer bestehenden kohlenhydratreichen Kost ernährt wurden. Die in den Tabellen als normal bezeichneten Kontrollen erhielten beliebig zu fressen und befanden sich durchweg in einem ausgezeichneten Ernährungszustand. Die Hungertiere erhielten nur Wasser. Der Diabetes wurde durch intraperitoneale Injektion von Alloxan 200 mg/kg ausgelöst, in den ersten 24 Std erhielten diese Tiere nur 5% Zuckerlösung zum Trinken. Das Alloxan war 3—5 Wochen vor den Versuchen gegeben worden. 3—4 Tage vor der Präparation kamen die Ratten einzeln in Stoffwechselkäfige, in denen die tägliche in den Tabellen angegebene Zuckerausscheidung festgestellt wurde. Die schwer diabetischen Tiere wurden, um sie in einem guten Allgemeinzustand zu halten, während dieser Tage mit reichlich Fleisch urd Käseresten gefüttert, die sie mit einer ungewöhnlichen Gier annahmen. Außerdem erhielten sie in einem zweiten Gefäß außer Brunnenwasser 1%ige Kochsalzlösung, die ganz ausgesprochen von den Tieren bevorzugt wurde, die mit ihrer großen Zuckermenge (8—14 g täglich) auch eine entsprechend große Urinmenge (100—200 cm^3) ausschieden. Die schwer zuckerkranken Ratten zeigten alle erheblich reduzierte Fettlager als Zeichen eines starken Gewichtsverlustes. Leider war versäumt worden, sie vor der Alloxaninjektion zu wiegen. Die erste Wägung erfolgte 3—4 Tage vor dem Versuch. Um eine Adrenalinausschüttung beim Töten zu vermeiden, erhielten die Tiere 2—1 Std vorher Urethan 1,8 g/kg. In tiefer Narkose wurden die beiden Karotiden durchtrennt. Aus dem rechten Oberschenkel und der Glutäalgegend wurde von Fettgewebe und Nerven

befreite Muskulatur entnommen, gewogen, mit der Schere zerkleinert, mit feinem Quarzsand zu einem homogenen Brei zerrieben und schließlich das 20fache des Gewichtes physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Sofort nach der Entnahme der Muskulatur erfolgte die des Fettgewebes. Dabei ist auf die im Depotfett eingebetteten Ductuli efferentes zu achten. Die weitere Präparation war wie die der Muskulatur. Eine Stunde nach dem Töten wurde durch Glasfiltertiegel (Schott 1 G 3) mit Filtrierpapierauflage abgenutscht und eine $^1/_2$ Std später der Fermentansatz zusammengegeben. Der eigentliche Versuch begann also immer $1^1/_2$ Std nach dem Tod des Tieres.

Die oft benutzte stagalometrische Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität nach Rona und Michaelis[11] erwies sich als wenig zuverlässlich und ergab sehr uneinheitliche Werte. Wir verwandten daher schließlich eine von Scoz[12] angegebene Methode mit einigen Modifikationen. Scoz gebraucht zur Bestimmung der Serumlipase 5 cm³ 4%ige Natriumzitratlösung mit 0,2 cm³ Tributyrin und Serum und bestimmt nach 2 Std (37°) nach Zusatz von 2 cm³ alkoholischer Phenolphthaleinlösung den Verbrauch an n/50 Kalilauge. Das von uns benutzte Tributyrin Merck änderte seinen Eigenverbrauch an Lauge, der für 0,2 cm³ immer zwischen 0,9 und 1,0 cm³ lag, während der ganzen Versuchsdauer nicht. Bei unseren ersten Untersuchungen gingen wir nach der Originalvorschrift vor. Die Ergebnisse, die wir hiermit erhielten, waren zwar grundsätzlich die gleichen wie mit der von uns benutzten Änderung. In dieser Vorschrift wird jedoch weder der Einfluß der Wasserstoffkonzentration zu Beginn der Reaktion, noch die Wirkung der zunehmenden Säuerung berücksichtigt. Da sich aber beim Vergleich ergab, daß das steigende p_H mit dem Fortschreiten der Tributyrinspaltung hemmend wirkt, haben wir unsere Ansätze zu Beginn der Versuche auf ein bestimmtes p_H eingestellt und von Stunde zu Stunde die entstandene Säure neutralisiert. Dadurch werden die Unterschiede im Gang der Reaktionen sehr viel deutlicher.

Die endgültige Anordnung war folgende: Kurze Zeit vor dem Versuchsbeginn wurde der Verbrauch an Lauge a) für 2 cm³ Gewebsextrakt, b) für 0,2 cm³ Fributyrin, c) für Fributyrin und 5 cm³ 4%ige Natriumzitratlösung und d) für den ganzen Ansatz (= a + c) bestimmt, dieser sofort nach dem Mischen. Die bei d) verbrauchte Alkalimenge wurde in 4 vorgewärmte Gläschen zur Zitrat-Tributyrinlösung gegeben, 2 cm³ Gewebsextrakt zugefügt, geschüttelt und die Gläschen in den 37° warmen Brutschrank gestellt. Nach 1 Std wurde das erste Glas entnommen, gegen Phenolphthalein titriert und die verbrauchte Lauge den übrigen 3 Gläschen zugesetzt, die damit wieder auf das Ausgangs-p_H von 8,2 gebracht waren. Nach einer weiteren Stunde wurde der zweite Ansatz titriert, den beiden übrigen wieder die verbrauchte Alkalimenge hinzugefügt, usw. ebenso auch nach der 3. und 4. Std. Bei jeder

Tabelle 1.

Art des Versuches	Versuch Nr.	Gewicht bei der Präparation g	Gewichtabnahme bis zur Präparation g	Hungertage	Ernährungszustand*	Täglicher Urinzucker g	Urin Azeton	Urin Azetessigsäure
A Normal	1	165 ♀						
	2	275 ♀						
	3	152 ♀						
	4	225 ♀						
B Hunger	5	325 ♂	—19	7	+++			
	6	215 ♀	—10,5	4	++			
	7	245 ♀	—13,5	4	++			
	8	145 ♂	—27,5	6	++			
C_1 Diabetes schwer	9	155 ♀			+++	8—10	++	
	10	160 ♀			++	8—12	+	0
	11	175 ♀	**		+++	12—14	+++	++
C_2 leicht	12	205 ♀			+	0,4—0,6	0	0
	13	202 ♀			+	0,8—1,2	0	0

* leicht abgemagert +, stark abgemagert ++, sehr stark abgemagert +++.
** Tier Nr. 10 in den letzten 4 Tagen keine Gewichtsabnahme, Nr. 9 und 11 in 4 Tagen 3 g abgenommen, Nr. 12 und 13 etwa 4 g zugenommen.

Titration war der Verbrauch notiert worden und damit war auch der Verbrauch je Stunde bekannt.

Versuchsergebnisse.

Die gefundenen Werte für die Lipaseaktivität der einzelnen Tierserien zeigen eine derartig geringe Schwankungsbreite und die Veränderungen bei den hungernden und diabetischen Tieren sind so konstant, daß aus der geringen Anzahl der Versuche sichere Schlüsse gezogen werden können.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist der Verbrauch an Lauge für 2 cm^3 Muskelextrakt, d. h. die Gewebssäuerung, bei hungernden und diabetischen Ratten größer als bei den normal gefütterten. Er beträgt für die Kontrollen 1,1 cm^3 (1,0—1,3), für die Hungertiere 1,5 cm^3 (1,3—1,6), für schwer diabetische 1,2, 1,3 und 1,6 cm^3, für leicht zuckerkranke 1,2 und 1,3 cm^3. Eine verwertbare Beziehung zur Gewichtsabnahme oder zum Ernährungszustand der einzelnen Tiere ist nicht erkennbar, die Hungertiere mit dem höchsten Gewichtsverlust zeigten keineswegs auch die stärkste Säuerung. Möglicherweise bestehen Beziehungen zum Ketonkörpergehalt der Gewebe, der nicht vom Ernährungszustand allein abhängig ist. Der Urin dieser Tiere war leider nicht auf Ketonkörper untersucht worden. Von den schwer diabetischen Ratten hatte das Tier Nr. 11, mit der stärksten Ketonurie auch die höchste Säuerung (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 2.

			Versuchsserie															
			A Normale Kontraktion					B Hunger					Diabetes					
													C_1 schwer				C_2 leicht	
			Versuch Nr.				M	Versuch Nr.				M	Versuch Nr.			M	Versuch Nr.	
			1	2	3	4		5	6	7	8		9	10	11		12	13
Muskel	I	0	1,0	1,1	1,0	1,3	1,1	1,4	1,6	1,8	1,3	1,5	1,2	1,3	1,6	1,4	1,3	1,2
		1h	0,6	0,6	0,3	0,4	0,5	0,9	1,5	1,2	0,7	1,1	0,7	1,5	1,0	1,1	0,7	0,6
		2h	1,3	1,2	0,7	0,8	1,0	2,1	3,2	2,4	1,8	2,4	1,7	3,2	2,4	2,4	1,7	1,4
	—	3h	2,1	2,0	1,3	1,3	1,7	3,2	4,3	4,6	3,6	3,9	2,7	4,4	3,9	3,7	2,8	2,3
		4h	2,8	2,5	1,7	1,7	2,2	4,5	5,3	5,4	4,4	4,9	3,5	5,4	4,9	4,6	3,6	3,3
Fett-gewebe	I	0	0,5	0.5	0,6	0,6	0,55	0,8	0,9	0,9	0,8	0,85	0,8	0,9	1,1	0,9	0 8	0,9
		1h	0,7	0,8	0,9	0,8	0,8	2,7	1,9	2,0	1,8	2,1	2,0	2,1	1,3	1,8	0,7	1,3
		2h	1,9	1,8	1,8	1,3	1,7	5,7	4,1	4,4	4,0	4,6	4,3	4,5	3,5	4,1	2,3	3,1
	—	3h	3,2	3,0	2,9	2,3	2,9	8,6	7,6	6,4	7,3	7,5	6,9	8,0	6,1	7,0	4,1	4,7
		4h	4,3	3,8	3,8	3,2	3,8	11,3	9,6	9,4	8,9	9,8	8,4	10,5	7,6	8,8	5,1	5,9

I Verbrauchte Lauge in Kubikzentimeter für 2 cm³ Gewebsextrakt. II desgleichen für die Fermentansätze nach 1, 2 usw. Std. M Mittelwert aus den einzelnen Versuchsserien.

Im Fettgewebe ist der Gehalt an titrierbarer Säure um etwa 50% geringer als im Muskel. Er nimmt im Hunger und Diabetes ebenfalls zu, ohne daß auch hier Beziehungen zum Gewichtsverlust zu bestehen scheinen. Den höchsten Wert zeigt wieder das Tier mit dem schwersten Diabetes.

Bei der Untersuchung der Lipaseaktivität ergibt sich, daß die in der Zeiteinheit gebildete Säure, bzw. der Verbrauch an Lauge der Zeit direkt proportional ist. Die geringen Abweichungen von der Geraden besonders in den ersten Stunden sind wohl dadurch zu erklären, daß noch keine völlige Temperaturangleichung stattgefunden hatte. In Abb. 1 ist der Reaktionsverlauf für die Muskulatur und das Fettgewebe graphisch dargestellt, wie er sich aus den Mittelwerten der Tabelle 2 ergibt. Auch die Werte bei den einzelnen Tieren zeigen immer einen annähernd geradlinigen Verlauf, der nur gering von der Mittelwertkurve abweicht. Der Verbrauch an Lauge beträgt nach 4 Std für den Muskelansatz der Kontrollen 2,2 cm³, bei einer maximalen Abweichung von + 0,6 bzw. — 0,5 cm³ entsprechend 28 und 23%. Dabei ist zu berücksichtigen, daß unsere Tiere an den verschiedenen Versuchstagen ein verschieden zusammengesetztes Futter erhielten und daß die letzte Nahrungsaufnahme bei den einzelnen Ratten sicher auch verschieden lange Zeit zurücklag. Unter einheitlicheren Versuchsbedingungen ist wahrscheinlich die Schwankung noch geringer. Im Hunger ist die lipolytische Fähigkeit der Muskulatur erheblich gesteigert

(Tabelle 2 und Abb. 1), im Durchschnitt um 122%. Die Lipaseaktivität der schwer diabetischen Tiere entspricht der der hungernden, sie ist gegenüber der Norm um 110% erhöht, wir haben daher in Abb. 1 diese Linie nicht eingetragen. Auch die leicht zuckerkranken Ratten zeigen eine deutliche, wenn auch nicht so ausgeprägte Zunahme.

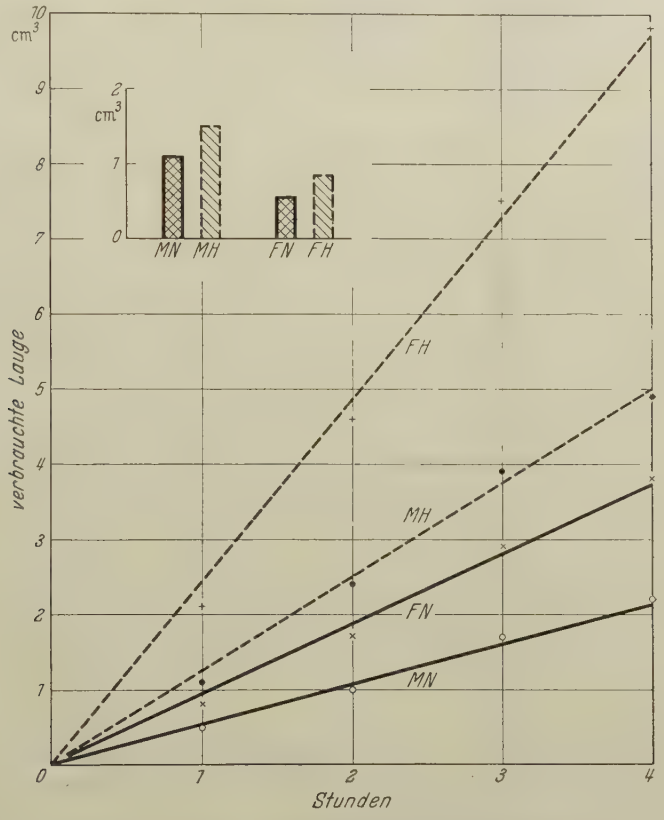


Abb. 1. *MN* Reaktionsverlauf für den Muskelextrakt normal gefütterter Tiere; *MH* desgleichen von Hungertieren; *FN* normales Fettgewebe; *FH* Fettgewebe von Hungertieren. Dargestellt nach den Mittelwerten der Tabelle 2 oben: Laugenverbrauch für 2 cm³ Gewebsextrakt.

Der Lipasegehalt des Fettgewebes ist von Anfang an ein größerer als der der Muskulatur (77%). Im Hunger kommt es auch hier zu einem erheblichen Anstieg, ebenso auch im schweren Diabetes, weniger im leichten (Tabelle 2).

Besprechung der Ergebnisse.

Die erhebliche Zunahme der Lipase im Hunger und Diabetes glauben wir darauf zurückführen zu dürfen, daß an Stelle der nicht genügend

vorhandenen oder verwertbaren Kohlenhydrate Neutralfett auch direkt von der Muskulatur verbrannt wird. Dieser Schluß scheint um so mehr berechtigt, da erwiesen ist (s. Einleitung), daß die Gewebe Fettsäuren unmittelbar oxydieren können, und hier gezeigt wurde, daß das Ferment, durch das sie aus den Neutralfetten abgespalten werden, bei Mangel an Kohlenhydraten zunimmt.

Überraschend ist der große Gehalt an Lipase im normalen Fettgewebe. Da dieses nur etwa den 10. Teil an Eiweiß enthält wie die Muskulatur[13], ist die in den Fettlagern vorhandene Menge, bezogen auf die Trägersubstanz — das Gewebseiweiß — mehr als 17mal so groß als im Muskel. Dies mag mit der spezifischen Funktion des Fettgewebes als Speicherorgan zusammenhängen, wie aus einigen anderen Versuchsergebnissen geschlossen werden darf. Die Fettgewebslipase ist nicht nur im Hunger vermehrt[14], sondern bei allen Zuständen, bei denen es zu einer Mobilisation des Depotfettes kommt. Sie nimmt zu, wenn unter Thyroxingaben das Körpergewicht sinkt[15], und wird weniger, wenn aus Glukose vermehrt Fett aufgebaut wird, bei Kohlenhydrat-[16] oder Insulinmast[17]. Ein entgegengesetztes Verhalten zeigt die Fettgewebsdiastase, die immer bei den Zuständen, die mit einer Fettsynthese einhergehen, in den Fettlagern ansteigt[18]. Wahrscheinlich benutzt auch das Fettgewebe ebenso wie der Muskel im Hunger in erhöhtem Maße Neutralfett zur Deckung des Energiebedarfes, doch ist wahrscheinlich der relativ große Gehalt an Lipase im normalen Fettgewebe und die Zunahme im Hunger bedingt durch eine bereits im Speichergewebe selbst stattfindende Spaltung der Neutralfette zu Transportzwecken. In den Fettzellen wird das Fett aus der Nahrung oder das aus den Kohlenhydraten synthetisierte nicht etwa bis zu dem Zeitpunkt nur gespeichert, zu dem dem Organismus keine anderen Energiequellen mehr zur Verfügung stehen, sondern dauernd erfolgt dort ein Zu- und Abstrom, die in ihrer Bilanz allerdings den Eindruck erwecken, daß das Depotfett sich nicht verändert[2, 18]. Im Hunger überwiegen dann die dissimilatorischen Vorgänge und dadurch werden die Lager entleert.

Die stärkere Säuerung ist als Ursache der vermehrten Lipaseaktivität auszuschließen, sie wirkte auch in unseren Versuchen, wie zu erwarten war, hemmend. Diesen Einfluß zeigen besonders die Oxybuttersäuren[19]. Gegen die Annahme, daß die Gewebslipase aus dem Blut stammt und deren Zunahme nur die Folge einer Speicherung ist — im Hunger ist bekanntlich die Serumlipase vermehrt — sprechen Versuchsergebnisse, über die wir demnächst berichten werden.

Zusammenfassung.

Der Lipasegehalt der Skeletmuskulatur und des Fettgewebes von Ratten, gemessen an der tributyrinspaltenden Fähigkeit von Gewebs-

extrakten ist ein sehr konstanter. Er ist höher im Fettgewebe als in der Muskulatur, bezogen auf den Eiweißgehalt beträgt er das 17fache. Er nimmt im Hunger und im schweren Diabetes über 100% zu, und ist auch beim leichten Diabetes deutlich gesteigert. Die Vermehrung in der Muskulatur wird als Zeichen einer gesteigerten Oxydation von Neutralfetten gedeutet. Für das Fettgewebe sind außerdem wahrscheinlich spezifische Funktionen, die mit der Fettmobilisation zu Transportzwecken zusammenhängen, die Ursache dieser Zunahme.

Literatur.

[1] Cori: Harvey Lect. (Am.) **41**, 253 (1946); weitere Literatur s. Hausberger: Ärztl. Forsch. **2**, 204 (1948). — [2] Hausberger: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 267 (s. Literatur). — [3] Barnes, Drury, Greely and Wick: Amer. J. Physiol. **130**, 144 (1940). — Crandall, Ivy and Elmi: Amer. J. Physiol. **131**, 10 (1940). — [4] Wick and Drury: J. biol. Chem. (Am.) **138**, 129 (1940). — [5] Drury: J. clin. Endocrinol. **3**, 101 (1943). — [6] Quagliariello: Mem. Acad. Ital. **4**, 17 (1933). — Z. angew. Chem. **47**, 370 (1934). — Lang u. Mitarb.: Z. physiol. Chem. **261**, 240, 249 (1939); **262**, 120 (1939). — Cremer: Z. physiol. Chem. **263**, 240 (1940). — [7] Shapiro and Wertheimer: Biochem. J. (Brit.) **37**, 102 (1943). — [8] Mulder and Crandall: Amer. J. Physiol. **133**, 392 (1941). — [9] Dye and Marsters: Feder. Proc. **2**, 11 (1943). — [10] Hausberger u. Glabasnia: Naunyn-Schmiedebergs Arch. (im Druck, dort weitere Literatur). — [11] Rona u. Michaelis: Biochem. Z. **31**, 345 (1911). — [12] Scoz: Klin. Wschr. **1940**, 1041. — [13] Wetzel, Wollschitt, Ruska u. Oestreicher: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **179**, 86 (1935). — [14] Quagliariello e Scoz: Arch. Sci. biol. (It.) **17**, 513 (1932). — [15] Scoz: Arch. Sci. biol. (It.) **20**, 253 (1934). — [16] Scoz: Arch. Sci. biol. (It.) **17**, 237 (1932). — [17] Scoz, Baer e Boeri: Arch. Sci. biol. (It.) **22**, 142 (1936). — [18] Hausberger u. Neuenschwander-Lemmer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 530 (1939), dort weitere Literatur. — [19] Benedict u. Mayer: Biochem. Z. **285**, 299 (1936).

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 426—436 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Kinetik der Hämiglobinbildung.

I. Mitteilung.

Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin in vivo.

Von

Manfred Kiese und Maria Soetbeer.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. April 1949.)

In der Kinetik der Hämiglobinbildung durch Amino- und Nitrobenzole nimmt das Phenylhydroxylamin eine Schlüsselstellung ein. Aus zahlreichen Untersuchungen[1–7] ist bekannt, daß Phenylhydroxylamin schneller Hämiglobin bildet als Anilin und Nitrobenzol. Es ist ferner bekannt, daß im Organismus einerseits Anilin zu Phenylhydroxylamin oxydiert[3] und andererseits Nitrobenzol zu Phenylhydroxylamin reduziert[2, 8] werden kann. Schließlich ist bekannt, daß Phenylhydroxylamin mit Hämoglobin und Sauerstoff stoichiometrisch ein Äquivalent Hämiglobin je Mol Phenylhydroxylamin bildet[9], im Tier aber jede Molekel Phenylhydroxylamin mehrere Äquivalente Hämoglobin oxydieren kann[4,5]. Auf Grund dieser Ergebnisse und vergleichender Untersuchungen über die Wirkung von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol[5, 10] nahmen Heubner[11] und Jung[5, 10] an, daß die Oxydation des Hämoglobins durch Phenylhydroxylamin in einem Kreisprozeß verläuft, in dem die Molekel entweder zwischen Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol oder zwischen Phenylhydroxylamin und einem Radikal

$$C_6H_5 — \underset{\dot{H}}{NO}$$

hin und her wechselt. Heubner[11, 12, 13] formulierte seine Vorstellung später noch genauer dahin, daß das Phenylhydroxylamin durch Sauerstoff zu dem erwähnten Radikal dehydriert werde:

[1] Lipschitz, W.: Z. physiol. Chem. **109**, 189 (1920). — [2] Lipschitz, W., u. J. Weber: Z. physiol. Chem. **132**, 251 (1923). — [3] Ellinger, Ph.: Z. physiol. Chem. **111**, 86 (1920). — [4] Issekutz, B. v. jr.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551, 567, 569 (1939). — [5] Jung, F.: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 208 (1940). — [6] Schlimme, H.: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 60 (1943). — [7] Herken, H.: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 70 (1943). — [8] Bueding, E., u. N. Jolliffe: J. Pharmacol. (Am.) **88**, 300 (1945). — Chem. Abstr. **41**, 510 (1947). — [9] Heubner, W., R. Meier u. H. Rhode: Arch. exper. Path. (D.) **100**, 149 (1923). — [10] Jung, F.: Biochem. Z. **305**, 248 (1940). — [11] Heubner, W.: Arb. II. Abt. Stefan Tisza Ges. **7**, H. 2 (1941). — [12] Heubner, W.: Klin. Wschr. **1942**, 961. — [13] Heubner, W.: Abh. dtsch. Akad. Wiss. Berl. Math.-naturw. Kl. **1948**, Nr 2. Arch. exper. Path. (D.) **205**, 310 (1948).

$$4\,C_6H_5 \cdot \underset{\dot{H}}{N} \cdot OH + O_2 \rightarrow 4\,C_6H_5 \cdot \underset{\dot{H}}{NO} \qquad (I)$$

und dieses unter Reduktion zu Phenylhydroxylamin das Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiere:

$$4\,C_6H_5\underset{\dot{H}}{N} \cdot O + 4\,Hb^{II} \rightarrow 4\,C_6H_5\underset{\dot{H}}{N} \cdot OH + 4\,Hb^{III} \qquad (II)$$

Darauf wiederhole sich Reaktion I usw. Diese katalytische Wirkung des Phenylhydroxylamins müßte dann bei unbeschränktem Sauerstoffvorrat solange laufen bis das gesamte Hämoglobin oxydiert wäre bzw. durch die Reduktion des Hämiglobins durch Phenylhydroxylamin[10, 14] ein Gleichgewicht einträte oder das Phenylhydroxylamin bzw. sein Oxydationsprodukt durch Nebenreaktion verschwände. Wäre Heubners Hypothese richtig, dann müßte das Phenylhydroxylamin auch in Lösungen von Hämoglobin und Sauerstoff außerhalb der roten Zellen katalytisch wirken. Das ist aber nicht der Fall[9, 15]. Unter diesen Bedingungen läuft nur eine einmalige sehr schnelle gekoppelte Reaktion ab[15], in der jede Molekel Phenylhydroxylamin nur einmal reagiert. Innerhalb der roten Zellen setzt jede Molekel Phenylhydroxylamin in Gegenwart von Sauerstoff und Glukose eine Vielzahl von Hämoglobinäquivalenten um[15]. An diesem Vorgang sind die enzymatischen Reaktionen, die auch die Reduktion des Hämiglobins ermöglichen[16], beteiligt[17].

In dieser Mitteilung beschreiben wir den Ablauf der Hämiglobinbildung im Hunde und die Abhängigkeit der Hämiglobinbildung von der Konzentration (Dosis) des Phenylhydroxylamins.

Die Änderung der Hämiglobinkonzentration nach der Zeit im Blute nach intravenöser Injektion von 1,5 mg/kg Phenylhydroxylamin ist in Abb. 1, Kurve Z wiedergegeben. Der Anstieg der Hämiglobinkonzentration (dc/dt) beginnt mit großer Geschwindigkeit, verlangsamt sich aber bald sehr stark und folgt nicht einer einfachen Exponentialfunktion, wie aus Abb.2, Kurve Z zu ersehen ist. Der Anstieg der Hämiglobinkonzentration ist jedoch nicht identisch mit der Hämiglobinbildung, da dauernd ein Teil des Hämiglobins wieder reduziert, und in der Hämiglobinkonzentration garnicht erfaßt wird. Errechnet man unter Berücksichtigung der Hämiglobinreduktion[18] die in verschiedenen Zeiten je Volumeneinheit Blut gebildete Menge Hämiglobin (Abb. 1, Kurve C; Abb. 2, Kurve A, B, C), so ergibt sich, daß die Hämiglobinmenge als Bruchteil der maximal gebildeten Hämiglobinmenge dem Logarithmus

[14] Keilin, D., u. E. F. Hartree: Nature (Brit.) **151**, 390 (1943). — [15] Kiese, M., u. D. Reinwein: Noch nicht veröffentlichte Messungen, Kiel 1948. — [16] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — [17] Kiese, M., u. H. D. Waller: Noch nicht veröffentlichte Untersuchungen, Kiel 1948. — [18] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, 453.

der Zeit proportional ist (Abb. 2, Kurve A, B, C). Die Neigung dieser Geraden ist von der Dosis des Phenylhydroxylamins abhängig. Dem-

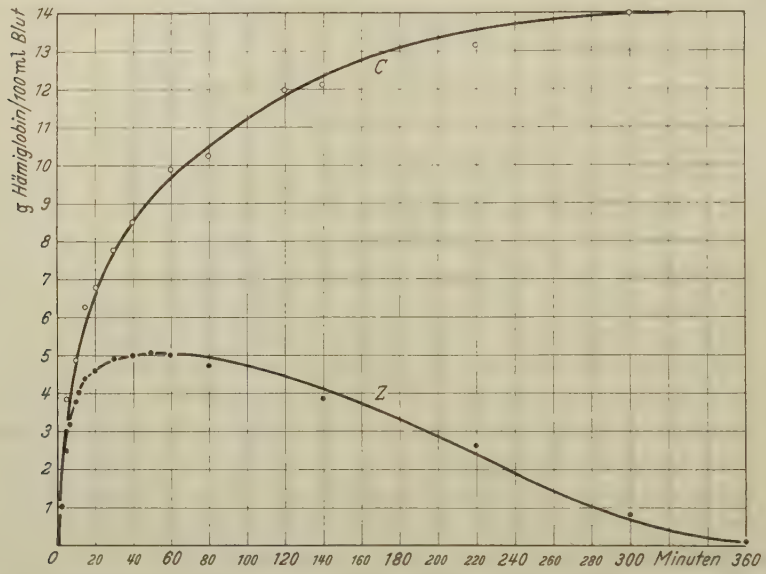


Abb. 1. Änderung der Hämiglobinkonzentration nach der Zeit (Kurve Z) und Ablauf der Hämiglobinbildung (Kurve C) im Blute des Hundes nach intravenöser Injektion von 1,5 mg/kg Phenylhydroxylamin.

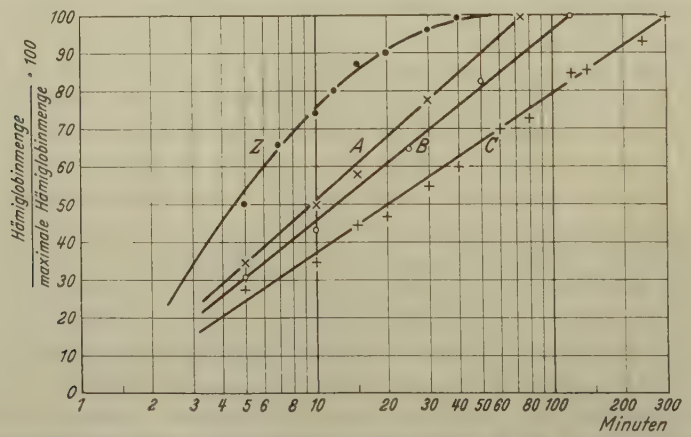


Abb. 2. Ablauf der Änderung der Hämiglobinkonzentration (Kurve Z) und der Hämiglobinbildung (Kurve A, B, C), im Blute des Hundes nach Injektion verschiedener Dosen Phenylhydroxylamin. Kurve A: 0,1 mg/kg Phenylhydroxylamin; Kurve B: 0,4 mg/kg Phenylhydroxylamin; Kurve C und Z: 1,5 mg/kg Phenylhydroxylamin. Abszisse logarithmisch geteilt: Zeit in Minuten. Ordinate: Hämiglobinkonzentration bzw. Mengen in Prozent der maximalen.

entsprechend ist auch die Zeit, die zwischen Injektion des Phenylhydroxylamins und der maximalen Hämiglobinkonzentration verstreicht,

von der Dosis abhängig und nimmt von 8 min bei Dosen von 10^{-3} mg/kg auf 30 min bei Dosen von 2 mg/kg zu.

v. Issekutz[4], Jung[5] und Schlimme[6] haben bereits an Katzen die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration durch intraperitoneale oder subkutan injizierte Dosen von 0,5—2,5 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Tier gemessen. Ihre Werte der maximal erreichten Hämiglobinkonzentrationen sind in Abb. 3 eingetragen neben unseren Messungsergebnissen am Hunde.

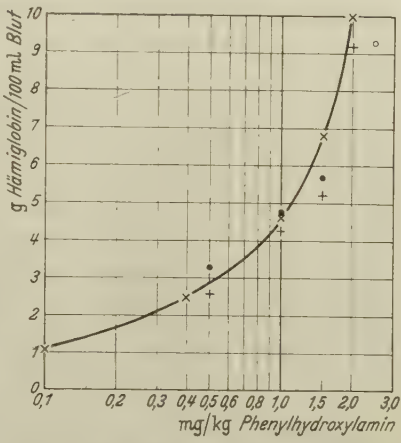


Abb. 3. Maximale Zunahme der Hämiglobinkonzentration in Abhängigkeit von Logarithmus der Phenylhydroxylamindosis. × × × Hund, Phenylhydroxylamin in wäßriger Lösung intravenös injiziert. + + + Katze, Phenylhydroxylamin in wäßriger Lösung subkutan injiziert (v. Issekutz[4]). ● ● ● Katze ebenso (Schlimme[6]). ○○○ Katze, Phenylhydroxylamin in ölige. Lösung intraperitoneal injiziert (Jung[5]). Die Werte sind Mittel aus 2—7 Messungen. Abszisse logarithmisch geteilt.

Mit der Verminderung der Dosis tritt nicht die nach bekannten Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung zu erwartende Abnahme der Hämiglobinbildung ein. Vielmehr nimmt diese besonders bei Verringerung der Dosis unter 0,1 mg/kg nur allmählich ab. Die maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration (Wirkungsstärke) ist nicht proportional dem Logarithmus der Dosis, also keine einfache Exponentialfunktion der Dosis, sondern wächst viel schneller als dieser. Um den ganzen Umfang der Dosen mit meßbarer Wirkung darzustellen, ist in Abb. 4 die maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration in logarithmischem Maßstab in Abhängigkeit von Logarithmus der Dosis dargestellt.

Die Dosis-Wirkungsfunktion für die maximale Hämiglobinkonzentrationserhöhung gemessen in Gramm Hämiglobin je 100 ml Blut (Abb. 4, Kurve 1) ist in diesem Koordinatensystem zwar noch keine Gerade, nähert sich ihr aber für Dosen über 0,1 mg/kg. Ausgedrückt als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffs (Kurve 3) ist der Logarithmus der Wirkungsstärke für Dosen über 0,05 mg/kg dem Logarithmus der Dosis proportional, d. h. zwischen Dosis und Wirkungsstärke besteht eine Potenzbeziehung, nämlich $W_{s,r} = 32 \cdot D^{0,8}$ [$W_{s,r}$ = Wirkungsstärke, Erhöhung der Hämiglobinkonzentration (Hämiglobin/Gesamtblutfarbstoff · 100), D = Dosis (mg/kg)]. Die gebildete Hämiglobinmenge (Wirkungsgröße) ist noch bis hinab zu Dosen von 0,01 mg/kg eine Potenzfunktion der Dosis: $W_g = 10 \cdot D^{0,75}$ [W_g = Wirkungsgröße, gebildetes Hämiglobin (g Hämiglobin je 100 ml Blut), D = Dosis

(mg/kg)]. Unter Dosen von 0,05 bzw. 0,01 mg/kg weichen Wirkungsstärke und -größe in ihrer Abhängigkeit von der Dosis von den genannten Potenzfunktionen ab, die Wirkungsstärke $W_{s,r}$ folgt für Dosen unter 0,05 mg/kg wieder einer neuen Potenzfunktion $W_{s,r} = 62 \cdot D^{0,24}$.

Die beschriebenen Dosis-Wirkungsfunktionen weisen bereits darauf hin, daß der von einer Molekel Phenylhydroxylamin geleistete mittlere Umsatz bei verschiedenen Dosen nicht gleich sein kann. In Abb. 5 ist

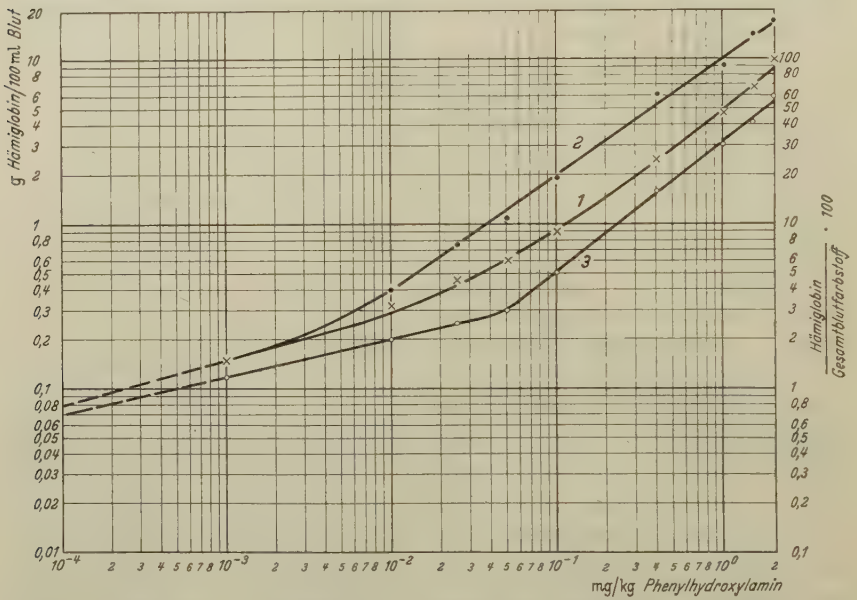


Abb. 4. Abhängigkeit der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration und der gebildeten Hämiglobinmenge von der Dosis Phenylhydroxylamin. Kurve 1: Erhöhung der Hämiglobinkonzentration in g/100 ml Blut (linker Ordinatenmaßstab). Kurve 3: Erhöhung der Hämiglobinkonzentration als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffs (rechter Ordinatenmaßstab). Kurve 2: je 100 ml Blut gebildete Menge Hämiglobin (linker Ordinatenmaßstab). Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

die Größe dieses Umsatzes in Abhängigkeit von der Dosis dargestellt. Für Dosen über 1 mg/kg ist der Umsatz konstant; jede Molekel Phenylhydroxylamin bildet im Mittel fast 50 Äquivalente Hämiglobin. Mit Verringerung der Dosis nimmt dieser Umsatz zu und erreicht für Dosen von 10^{-3} mg/kg den Wert von 700 Äquivalenten Hämiglobin je Molekel Phenylhydroxylamin. Der mittlere Umsatz der einzelnen Phenylhydroxylaminmolekel ist annähernd eine Potenzfunktion der Dosis $U = 45 \cdot D^{-0,4}$ $\left(U = \frac{\text{Äquivalent Hämiglobin}}{\text{Mol Phenylhydroxylamin}}, D = \text{Dosis (mg/kg)}\right)$.

In erster Annäherung ist der Ablauf der Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und dessen Dosis-Wirkungsfunktion wohl so zu verstehen, daß durch mehrere Vorgänge (Ausscheidung, Nebenreaktionen)

der an sich schon komplizierte „Kreisprozeß" der Hämiglobinbildung (durch Phenylhydroxylamin, Sauerstoff und gewisse Fermentsysteme) gestört wird. Die Geschwindigkeit des Ablaufs jener Vorgänge ist keine einfache Funktion der Phenylhydroxylaminkonzentration im Blut, sondern verlangsamt mit Verminderung der Phenylhydroxylaminkonzentration stark. Ferner können Besonderheiten der Kinetik des „Kreisprozesses" der Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin, an dem Enzymreaktionen beteiligt sind, mitbestimmend sein. Wir

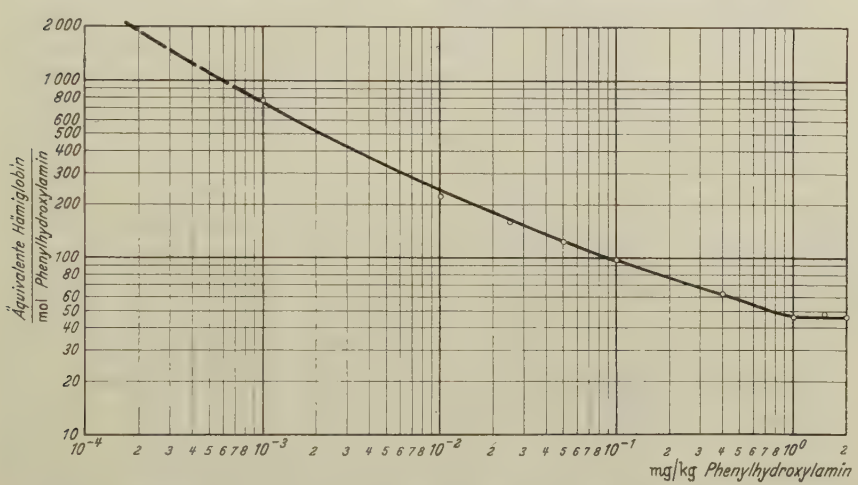


Abb. 5. Abhängigkeit der je Mol Phenylhydroxylamin im Blute oxydierten Äquivalente Hämoglobin von der dem Hunde intravenös injizierten Dosis Phenylhydroxylamin. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

werden in einer späteren Mitteilung, die diese enzymatischen Reaktionen beschreibt, die hier beschriebenen Ergebnisse noch eingehender erörtern.

Schließlich sei noch auf die Bedeutung der Messungsergebnisse für das allgemeine pharmakologische Problem der Abhängigkeit der Stärke und Größe einer pharmakologischen Wirkung von der Dosis eines Giftes hingewiesen. Für eine Reihe von Giften ist die Wirkungsstärke als einfache Exponentialfunktion der Dosis gefunden worden, wenigstens im Bereich leicht meßbarer Wirkungsstärken. De Rudder[19] wies darauf hin, daß die einfache logarithmische Dosis-Wirkungsbeziehung in einem gewissen Bereich eine Annäherung an eine Wahrscheinlichkeitsfunktion sein könnte, die er als die allgemeine Dosis-Wirkungsfunktion annimmt. Die starke Abweichung der Dosis-Wirkungsfunktion von der Wahrscheinlichkeitsfunktion wird am besten in Abb. 6 veranschaulicht. Der Hämiglobingehalt als Anteil des Gesamtblutfarbstoffs

[19] Rudder, B. de.: Naturw. **31**, 577 (1943).

[(Hämiglobin/Gesamtblutfarbstoff) · 100] in Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis ist in ein Wahrscheinlichkeitsnetz[20] eingetragen, in dem die Wahrscheinlichkeitsfunktion als Gerade erscheint. Eine Gerade, die also eine Summenkurve der reagierenden Elemente (in unserem Falle Hämoglobinmolekeln oder roten Zellen) darstellte, wenn diese ein Wahrscheinlichkeitsintegral wäre, ist durch die Werte von 30—60% Hämiglobin gelegt. Geringere Wirkungsstärken weichen jedoch sehr erheblich von dieser Geraden ab. Die Wahrscheinlichkeitsfunktion kann nicht als die allgemeine Dosis-Wirkungsfunktion gelten.

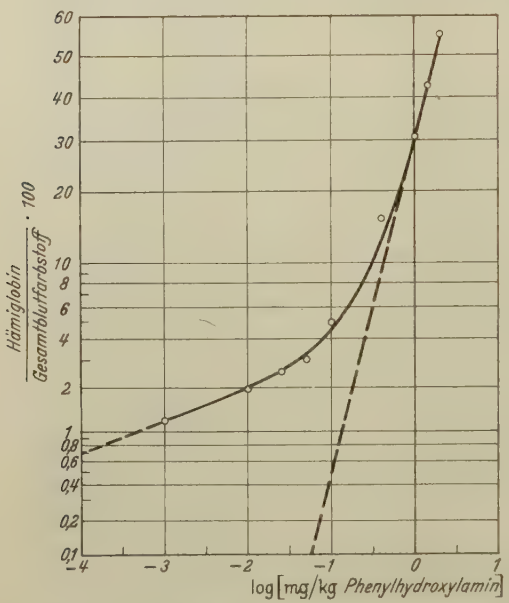


Abb. 6. Abhängigkeit der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration durch intravenös injiziertes Phenylhydroxylamin vom Logarithmus der Dosis, dargestellt im Wahrscheinlichkeitsnetz.
——— Kurve durch die Messungsergebnisse;
— — — Wahrscheinlichkeitsfunktion.

Versuche.

a) Methoden.

Die Untersuchungen wurden an ausgewachsenen Hunden durchgeführt. Phenylhydroxylamin wurde nach BAMBERGER[21] und WOHL[22] dargestellt und bis zum Schmelzpunkt von 81° wiederholt aus Benzol umkristallisiert. Zur intravenösen Injektion wurde es in Wasser gelöst, aus dem der Sauerstoff durch Einleiten von Kohlendioxyd entfernt war. Durch Verdünnungen mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung, die ebenfalls mit Kohlendioxyd gesättigt war, wurden geeignete Verdünnungen hergestellt, so daß die Dosis in etwa 10 ml Lösung enthalten war. Diese wurde im Laufe von 1—1½ min intravenös injiziert, nachdem vorher zweimal Blutproben im Abstand von etwa 5 min entnommen worden waren zur Bestimmung des normalen Hämiglobingehaltes. Nach Beendigung der Injektion wurden Hämiglobinbestimmungen zunächst im kurzen (2 bis 3 min), später in längeren Zeitabständen durchgeführt bis der Ausgangswert wieder erreicht war. Die Hämiglobinkonzentration wurde im Venenblut nach der Methode von KIESE[23] gemessen, die Konzentration an Gesamtblutfarbstoff nach Oxydation des Hämoglobins mit Eisen(III)zyanid ebenfalls als Hämiglobin. Bei der Zurichtung der Blutproben für die Hämiglobinbestimmung wurden alle Kautelen beachtet, dir für eine genaue Bestimmung des Hämiglobins im Blute erforderlich sind (KIESE[23, 24]). Nach der Entnahme aus der Vene und Vermischung

[20] HAZEN, A.: Trans. amer. Soc. Ind. Eng. **77**, 1539 (1914). — [21] BAMBERGER, E.: Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 1347 (1890). — [22] WOHL, A.: Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 1432 (1890). — [23] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 190 (1947). — [24] HEUBNER, W., M. KIESE, M. STUHLMANN u. W. SCHWARZKOPFF: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 313 (1947).

mit einer kleinen Menge pulverisierten Natriumzitrats wurden 0,5 ml Blut sofort in etwa 80 ml Wasser hämolysiert, das durch Durchleiten reinen Kohlenoxyds von Sauerstoff befreit und mit Kohlenoxyd gesättigt war. Nach Zusatz von 10 ml 0,2 molarer Phosphatlösung vom p_H 6,5 wurde mit Kohlenoxyd gesättigtem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Dann wurde unter Rühren nochmals mit Kohlenoxyd gesättigt, die Stromata abzentrifugiert und danach nochmals mit Kohlenoxyd gesättigt. Photometriert wurde mit den Geräten von Havemann[25] und Kortüm[26]. Für die indirekte photometrische Bestimmung des Hämiglobins nach der Kohlenoxydmethode ist eine möglichst weitgehende Ausschaltung des roten Kontinuums der Emission der Quecksilberlampe erforderlich (Filter VG 9!), da bei der Überführung des Hämiglobins in Kohlenoxydhämoglobin eine Abnahme der Extinktion um 630 mμ eintritt, die Messung jedoch auf der *Zunahme* der Extinktion bei 546 und 577 —579 beruht. Darum ist es nicht zweckmäßig zu konzentrierte Blutlösungen oder zu große Schichten für die Bestimmung geringer Hämiglobinkonzentrationen im Blute zu verwenden. Die hohe Hämoglobinkonzentration absorbiert viel Licht, so daß die *absolute* Zunahme der ausfallenden Lichtintensität bei 546 bzw. 577—579 mμ nach Überführen des Hämiglobin in Kohlenoxydhämoglobin nur gering ist. Auch bei verhältnismäßig guter Abfilterung des roten Kontinuums kann unter extremen Bedingungen die Abnahme der Extinktion im roten Gebiet stören. Wir wählten darum Verdünnungen des Blutes von 0,5 ml auf 100 ml Lösung und Schichten von 20 mm. Während wir im Havemannschen Photometer mit den gelben und grünen Quecksilberlinien maßen, benutzten wir im Kortümschen Gerät nur die grüne (Filter GG 11, VG 9, BG 20).

Bestimmungen der Blutmenge wurden an einigen Hunden durch Injektion von Kongorot und dessen photometrische Bestimmung im Serum durchgeführt.

Zur photometrischen Registrierung der Hämiglobinbildung wurden Hunden und Katzen in Choralosenarkose Elemente nach Kramer[27] an die Karotis gelegt und die Zunahme der Lichtabsorbtion des Blutes durch Hämiglobinbildung als Galvanometerausschlag optisch registriert.

b) Ergebnisse.

Den Anstieg der Hämiglobinkonzentration haben wir sowohl durch Analyse von Blutproben, die in Abständen von 2—3 min entnommen wurden, wie durch fortlaufende photoelektrische Registrierung der Lichtdurchlässigkeit einer A. carotis im Kramerschen Element verfolgt. Die Blutanalysen ergaben Werte mit geringerer Streuung als die Messungen mit der Kramerschen Methode. Durch die fortlaufende Registrierung ist eine Untersuchung des Beginns der Reaktion ebenfalls nicht möglich. Um lokale Erhöhungen der Phenylhydroxylaminkonzentration zu vermeiden, mußte die Injektion des Phenylhydroxylamins so langsam erfolgen, daß das Blut inzwischen wenigstens einmal den Kreis durchlief. So stieg schon während der Injektion in die Beinvene der Hämiglobingehalt im Karotisblut allmählich an. Erst nach Beendigung der Injektion nahm die Hämiglobinbildung hohe Geschwindigkeit an. In Abb. 7 ist eine Registrierung der Hämiglobinbildung in der Katze wiedergegeben, die diesen Verlauf zeigt. Aus diesen Kurven ist nicht sicher zu ersehen, ob der zunächst allmähliche Anstieg der Hämiglobin-

[25] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939). — [26] Kortüm, G.: Chem. Techn. **15**, 167 (1942). — [27] Kramer, K.: Z. Biol. **95**, 127 (1934); **96**, 61 (1935).

konzentration nur durch die langsame Infusion oder auch durch ein langsames Anlaufen der Hämiglobinbildungsreaktion bedingt wird.

Die gemessenen Erhöhungen der Hämiglobinkonzentration und die errechneten Mengen des gebildeten Hämiglobins nach Dosen von 0,001 bis 5 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Tier sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Werte sind die Mittel der genannten Zahl von Versuchen mit der Streuung des Mittels. Unter maximaler Erhöhung der Hämiglobinkonzentration wird verstanden: Höchste beobachtete Hämiglobinkonzentration minus normale Hämiglobinkonzentration. Die

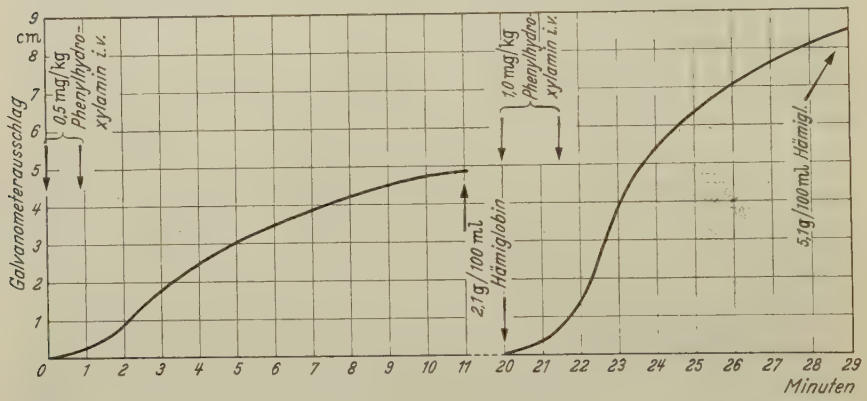


Abb. 7. Ablauf der Zunahme der Hämiglobinkonzentration in der Katze nach intravenöser Injektion von Phenylhydroxylamin. Photoelektrische Registrierung der Zunahme der Lichtabsorption des Blutes in der Arteria carotis. Die Kurven sind den Originalaufnahmen nachgezeichnet unter Raffung der Abszisse.

wirklich gebildete Hämiglobinmenge je 100 ml Blut ist aus der Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion[18] errechnet. In diesen Werten ist allerdings die — noch unbekannte — Menge Hämiglobin, die vom Phenylhydroxylamin reduziert wird, nicht enthalten. Ferner ist in der Tabelle die Zeit genannt, die zwischen der Injektion und dem Maximum der Hämiglobinkonzentration verstrich, sowie der Quotient Äquivalente gebildetes Hämiglobin/Mole Phenylhydroxylamin je Liter Blut. Für die Berechnung dieses Wertes wurde angenommen, daß die Phenylhydroxylaminkonzentration im Blute gleich injizierte Phenylhydroxylaminmenge/Blutmenge ist. Als Blutmenge wurde nach mehreren Bestimmungen mit Kongorot der Wert von 80 ml Blut je Kilogramm Tier eingesetzt. Der Quotient bezieht sich also auf die Gesamtmenge des injizierten Phenylhydroxylamins und nicht nur auf den Bruchteil, der tatsächlich längere Zeit im Blute wirksam ist. Solche Molekeln haben also weit höhere Umsatzzahlen.

Die Wirkungsstärke von 5 mg/kg Phenylhydroxylamin konnte nicht bestimmt werden, da schon 10 min nach der Injektion eine

Tabelle 1. *Größte Erhöhung der Hämiglobinkonzentration und je 100 ml Blut gebildete Hämiglobinmenge nach intravenöser Injektion von Phenylhydroxylamin in Dosen von 0,001 bis 5 mg/kg beim Hunde. Die Werte sind die Mittel aus der angegebenen Zahl von Versuchen und die Streuung des Mittels.*

Zahl der Versuche	Dosis Phenylhydroxylamin mg/kg	Phenylhydroxylaminkonzentration im Blut Mol/l	Maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration		Gebildete Hämiglobinmenge		Äquivalent Hämiglobin je Mol Phenylhydroxylamin	Höchste Hämiglobinkonzentration nach der Injektion min
			g/100 ml Blut	Prozent des Gesamtblutfarbstoffes	g/100 ml Blut	Äquivalent/l Blut		
1*	5,0	$5{,}7 \cdot 10^{-4}$	9,3	89				
2	2,0	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	$10 \pm 0{,}2$	$61 \pm 2{,}0$	$18{,}2 \pm 0{,}9$	$(1{,}2 \pm 0{,}08) \cdot 10^{-2}$	$46 \pm 2{,}5$	30
3	1,5	$1{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}8 \pm 0{,}2$	$43 \pm 3{,}0$	$14{,}1 \pm 0{,}7$	$(8{,}2 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-3}$	$48 \pm 2{,}1$	35
3	1,0	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$4{,}7 \pm 0{,}8$	$31 \pm 3{,}1$	$8{,}9 \pm 0{,}7$	$(5{,}2 \pm 0{,}5) \cdot 10^{-3}$	$46 \pm 2{,}1$	20
6	0,4	$4{,}9 \cdot 10^{-5}$	$2{,}5 \pm 0{,}3$	16 ± 1	$6{,}6 \pm 0{,}7$	$(3{,}7 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-3}$	62 ± 11	22
5	0,1	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$	$0{,}9 \pm 0{,}1$	5 ± 1	$1{,}9 \pm 0{,}4$	$(1{,}1 \pm 0{,}2) \cdot 10^{-3}$	97 ± 14	14
5	0,05	$5{,}9 \cdot 10^{-6}$	$0{,}6 \pm 0{,}06$	$3 \pm 0{,}3$	$1{,}1 \pm 0{,}2$	$(6{,}5 \pm 1\ ) \cdot 10^{-4}$	122 ± 20	16
4	0,025	$2{,}9 \cdot 10^{-6}$	$0{,}46 \pm 0{,}05$	$2{,}6 \pm 0{,}3$	$0{,}75 \pm 0{,}08$	$(4{,}4 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-4}$	159 ± 15	10
10	0,01	$1{,}1 \cdot 10^{-6}$	$0{,}32 \pm 0{,}05$	$2{,}0 \pm 0{,}3$	$0{,}4 \pm 0{,}06$	$(2{,}4 \pm 0{,}3) \cdot 10^{-4}$	220 ± 27	10
6	0,001	$1{,}1 \cdot 10^{-7}$	$0{,}15 \pm 0{,}04$	$1{,}2 \pm 0{,}3$	$0{,}15 \pm 0{,}04$	$(8{,}8 \pm 2\ ) \cdot 10^{-5}$	770 ± 190	10

* 10 min nach der Injektion des Phenylhydroxylamins, bevor noch die höchste Hämiglobinkonzentration erreicht war, wurden 17 mg/kg Toluidinblau intravenös injiziert um die Hämiglobinreduktion zu beschleunigen und dadurch die lebensbedrohliche Anoxie zu beseitigen.

lebensbedrohliche Anoxie eintrat, die durch Beschleunigung der Hämiglobinreduktion mit Toluidinblau beseitigt wurde.

In der Tabelle ist nur die Wirkung von Dosen bis hinab auf 0,001 mg/kg angegeben und nur diese Werte sind oben verwandt worden. Hämiglobin wird sicher auch noch von kleineren Dosen gebildet. Die Streuung macht jedoch zur quantitativen Bestimmung dieser Wirkungen eine außerordentlich große Zahl von Messungen erforderlich.

Zusammenfassung.

Der Ablauf der Hämiglobinbildung nach intravenöser Injektion von Phenylhydroxylamin und die Abhängigkeit der Wirkungsstärke und -größe des Phenylhydroxylamins von der Dosis wurden am Hunde untersucht.

Der Anstieg der beobachteten Hämiglobinkonzentration folgte nicht einer einfachen Reaktionsordnung. Die Zunahme des gesamten gebildeten Hämiglobins jedoch klang annähernd exponentiell ab.

Wirkungsstärke (Erhöhung der Hämiglobinkonzentration) und Wirkungsgröße (gebildete Menge Hämiglobin) des Phenylhydroxylamins waren weder der Dosis noch deren Logarithmus proportional. Für Dosen über 0,01 mg/kg war die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration, ausgedrückt als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffs, eine Potenzfunktion der Dosis $W_{s,r} = 32 \cdot D^{,8}$, und ebenso die je 100 ml Blut gebildete Hämiglobinmenge $W_g = 10 \cdot D^{,75}$. Für kleinere Dosen wich die Wirkung von diesen Funktionen ab. Die Wirkungsstärke folgte dann einer anderen Potenzfunktion $W_{s,r} = 62 \cdot D^{,4}$.

Nach Dosen über 1 mg/kg bildete jede Molekel Phenylhydroxylamin im Mittel 50 Äquivalente Hämiglobin. Mit Verringerung der Dosis nahm die mittlere Wirksamkeit der einzelnen Molekel zu und erreichte bei Dosen von 10^{-3} mg/kg bereits 700 Äquivalente Hämiglobin je Molekel Phenylhydroxylamin.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 437—445 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Kinetik der Hämiglobinbildung.

II. Mitteilung.

Hämiglobinbildung durch Nitrit in vivo.

Von

Manfred Kiese und Maria Soetbeer.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. April 1949.)

Meier[1] hat gefunden, daß Nitrit bei einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H 5 mit Hämoglobin stoichiometrisch reagiert unter Bildung eines Äquivalentes Hämiglobin je Mol Nitrit. Bei p_H 7 wurde mehrfacher Überschuß von Nitrit zur quantitativen Oxydation des Hämoglobins benötigt. Demgegenüber fand v. Issekutz[2] nach subkutaner Injektion von 7,5—30 mg/kg Nitrit bei Katzen, berechnet für das gesamte Nitrit, einen Umsatz von 1 Äquivalent Hämoglobin je Mol Nitrit. v. Issekutz glaubte damit nachgewiesen zu haben, daß Nitrit im Organismus mit Hämoglobin stoichiometrisch reagiert wie nach Meiers Messungen bei p_H 5. Heubner[3] verzeichnet es immerhin als sehr bemerkenswert, „daß das Nitrit offenbar durch die bei der Umsetzung mit Hämoglobin eintretende Konzentrationsverminderung innerhalb kurzer Zeit sozusagen quantitativ in die Blutkörperchen hineingezogen und dort zum Umsatz gebracht wird". Während Meier die Bildung eines Äquivalentes Hämiglobin je Mol Nitrit fand, kamen später Greenberg, Lester und Haggard[5], die bei der Untersuchung der Reaktion zwischen Hämoglobin und Nitrit auch die Abnahme der Nitritkonzentration maßen, zu dem Schluß, daß jedes Mol Nitrit, das zur Reaktion kommt, 2 Äquivalente Hämoglobin oxydiert. Remmers[6] Messungen ergaben ebenfalls die Oxydation von 2 Hämen durch jede Molekel Nitrit bei p_H 6,7 und 40° C. In der Annahme, daß das Nitrit im Gegensatz zum Phenylhydroxylamin[7] im Organismus im Gesamtumsatz Hämoglobin stoichiometrisch oxydiert, haben wir den Verlauf der Hämiglobinbildung im Hunde nach intravenöser Injektion von Nitrit untersucht. Die

[1] Meier, R.: Arch. exper. Path. (D.) **110**, 241 (1925). — [2] Issekutz, B. v. jr.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551 (1939). — [3] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1949). — [4] Austin, J. H., u. D. L. Drabkin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 67 (1935). — [5] Greenberg, L. A., D. Lester u. H. W. Haggard: J. biol. Chem. (Am.) **151**, 665 (1943). — [6] Remmer, H.: Diss. Berlin 1945. — [7] Kiese, M., u. M. Soetbeer: Arch. exper. Path. (D.) **207**, 426 (1949).

Ergebnisse unserer Messungen sind jedoch mit der Annahme einer nur einmaligen Reaktion jeder Nitritmolekel mit dem Hämoglobin nicht vereinbar. Wie in unseren Versuchen über die Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin[7] fanden wir für kleine Dosen unerwartete Beziehungen zwischen Dosis und Wirkungsstärke sowie für den Mindestumsatz, den eine Molekel Nitrit in den roten Zellen leistet. In Abb. 1 ist der Verlauf der Änderung der Hämiglobinkonzentration und der Hämiglobinbildung nach intravenöser Injektion von 20 mg/kg Natriumnitrit dargestellt. Der Anstieg der Hämiglobinkonzentration nach der

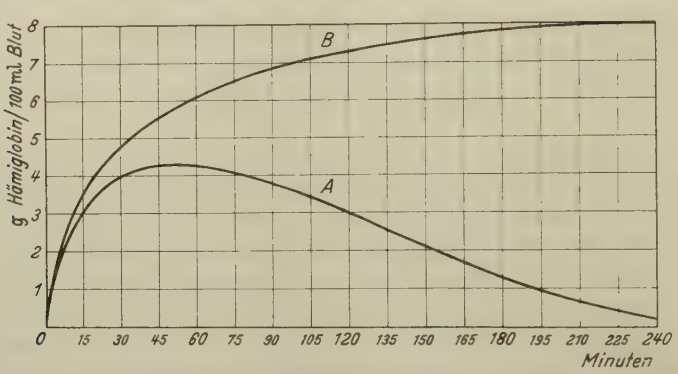


Abb. 1. Änderung der Hämiglobinkonzentration (Kurve A) und Zuwachs der gebildeten Hämiglobinmenge (Kurve B) im Hunde nach der intravenösen Injektion von 20 mg/kg Natriumnitrit.

Zeit folgt keiner einfachen Funktion, wohl aber der Zuwachs der gebildeten Menge Hämiglobin, die aus der Hämiglobinkonzentration und der Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion zu berechnen ist[8]. Dieser klingt nämlich exponentiell ab. In Abb. 2 ist dieser Ablauf aus einem Versuch mit einer Dosis von 20 mg Natriumnitrit je Kilogramm und schon früher veröffentlichten Versuchen[9] mit 25 mg/kg an der Porportionalität zwischen dem Bruchteil des maximal gebildeten Hämiglobins und dem Logarithmus der Zeit zu ersehen. Geringe Abweichungen ergeben sich für den Anfang der Reaktion. Es werden nämlich meist in den ersten Minuten nach der Injektion etwas größere Mengen Hämiglobin gebildet als dem späteren Verlauf entsprechen. Aus diesem Verlauf der Hämiglobinbildung können freilich keine zuverlässigen Schlüsse auf die beteiligten Elementarreaktionen gezogen werden, da deren mehrere zusammenwirken. Für die Reaktion zwischen Hämoglobin, Sauerstoff und Nitrit in geschlossenem System fand REMMER[6] einen autokatalytischen Verlauf. Da wir diese Ergebnisse noch erörtern müssen und sie nicht allgemein zugänglich sind, sei eine Abbildung

[8] KIESE, M.: Klin. Wschr. **1947**, 453. — [9] KIESE, M., u. H. ZÜRCHER: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 288 (1947).

Remmers hier wiedergegeben (Abb. 3). Sie zeigt, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Hämiglobinbildung sehr stark von der Nitritkonzentration abhängig ist.

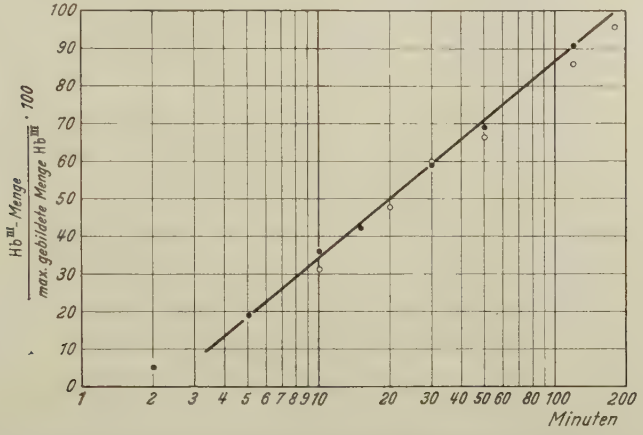


Abb. 2. Zunahme der je 100 ml Blut gebildeten Menge Hämiglobin mit dem Logarithmus der Zeit nach intravenöser Injektion von 20 mg/kg (● ● ●) und 25 mg/kg (ooo) Natriumnitrit beim Hunde.

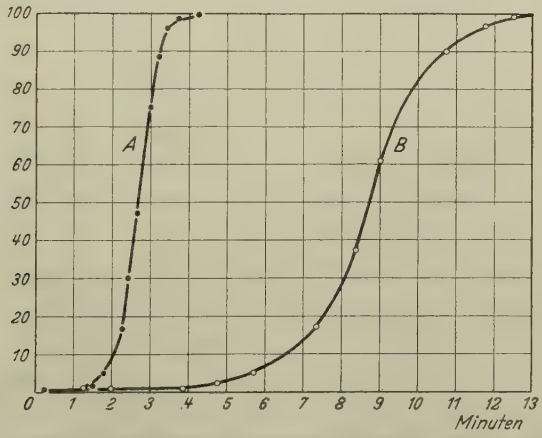


Abb. 3. Ablauf der Hämiglobinbildung durch Nitrit in vitro. Hämoglobinkonzentration $7{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol/l; pH = 6,7, Temperatur = 25° C; Kurve A: Nitrit $4{,}3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; Kurve B: $2{,}1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; Daten von Remmer[6].

Für die maximale beobachtete Hämiglobinkonzentration im Blut nahm v. Issekutz[2] eine lineare Abhängigkeit von der Dosis Nitrit an, obwohl seine veröffentlichten Messungen an Katzen, denen Nitrit subkutan injiziert war, diesen Schluß eigentlich nicht zulassen. Hug[10]

[10] Hug, E.: C. r. Soc. Biol. **114**, 947 (1933). — Rev. Soc. argent. Biol. **9**, 461 (1933).

hat bereits Messungen der Hämiglobinbildung in Hunden nach intravenöser Injektion von 10—40 mg Natriumnitrit je Kilogramm durchgeführt. Aus seinen Messungen sind die Dosis-Wirkungsfunktionen aber noch nicht sicher zu errechnen. Die maximale Hämiglobinkonzentration wächst nach unseren Messungen nicht ganz linear mit der Dosis, sondern steht mit dieser, wie Abb. 4, Kurve 1 zeigt, für Dosen über

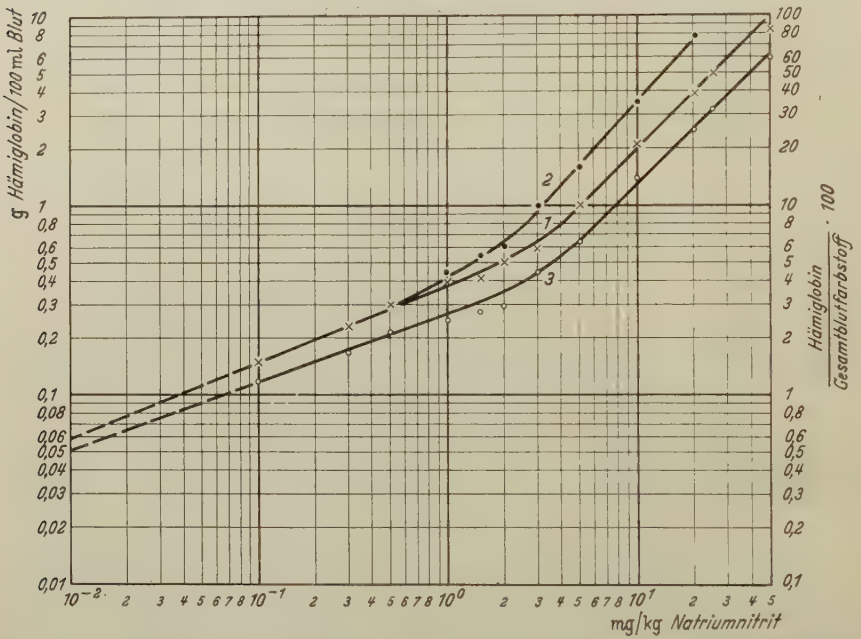


Abb. 4. Abhängigkeit der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration und der gebildeten Hämiglobinmenge von der Dosis Natriumnitrit. Kurve 1: Erhöhung der Hämiglobinkonzentration in g/100 ml Blut (linker Ordinatenmaßstab). Kurve 2: je 100 ml Blut gebildete Menge Hämiglobin (linker Ordinatenmaßstab). Kurve 3: Erhöhung der Hämiglobinkonzentration als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffs (rechter Ordinatenmaßstab). Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

1 mg/kg in der Potenzbeziehung $W_s = 0{,}2 \cdot D^{0{,}9}$ [W_s = Wirkungsstärke (g Hb^{III}/100 ml Blut), D = Dosis (mg/kg)]. Wird die Hämiglobinkonzentration als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffs ausgedrückt, so ergibt sich für den gleichen Dosenbereich die Potenzbeziehung: $W_{s,r} = 1{,}6 \cdot D^{0{,}95}$ [$W_{s,r}$ = Wirkungstärke (Hämiglobin/Gesamtblutfarbstoff · 100), D = Dosis (mg/kg)].
Der Dosis proportional ist die je 100 ml Blut gebildete Hämiglobinmenge (W_g) nämlich $W_g = 0{,}3 \cdot D$.

Für Dosen unter 1 mg/kg gelten die genannten Dosis-Wirkungsfunktionen nicht mehr. Wirkungsstärke und Wirkungsgröße erscheinen als andere Potenzfunktionen der Dosis, die in einem kurzen Übergangs-

bereich in die ersteren übergehen; dann ist $W_{s,r} = 2{,}5 \cdot D^{0{,}32}$ und W_g $0{,}4 \cdot D^{0{,}4}$ (Abb. 4).

Daß die maximale beobachtete Hämiglobinkonzentration und die wirklich gebildete Hämiglobinmenge nicht die gleiche Abhängigkeit von der Dosis zeigen, wird durch die Kinetik der Hämiglobinreduktion bedingt, die nicht als Reaktion erster Ordnung verläuft[8].

Der Anstieg der Hämiglobinkonzentration im Blute ist beendet, wenn die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung auf die Geschwindig-

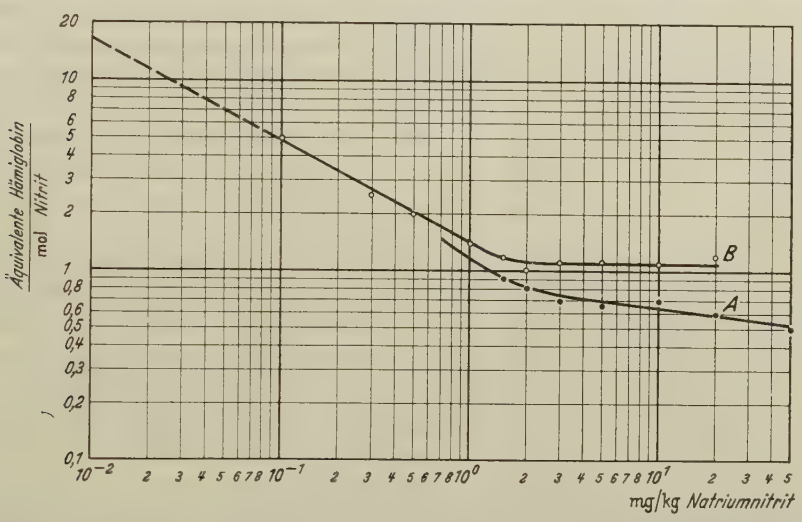


Abb. 5. Abhängigkeit der je Mol Nitrit oxydierten Äquivalente Hämoglobin von der dem Hunde intravenös injizierten Dosis Natriumnitrit. Kurve A: Hämiglobinbildung nach der beobachteten maximalen Hämiglobinkonzentration. Kurve B: errechnete je 100 ml Blut wirklich gebildete Hämiglobinmenge. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

keit der Hämiglobinreduktion absinkt. Zu diesem Zeitpunkt hat die Kurve der Hämiglobinkonzentration nach der Zeit ihr Maximum. Die Zeit vom Reaktionsbeginn bis zum Maximum der Hämiglobinkonzentration nimmt mit der Dosis zu, nicht linear, sondern wahrscheinlich als Exponentialfunktion. Unsere Werte streuen zu stark für eine bessere Charakterisierung. Eine ähnliche Beziehung ist zu erwarten, da die Hämiglobinbildung exponentiell abklingt und die Hämiglobinreduktion bei höherer Hämiglobinkonzentration von dieser nur wenig beeinflußt wird.

Errechnet man unter der Annahme, daß das gesamte intravenös injizierte Nitrit mit dem Hämoglobin zur Reaktion kommt, den mittleren von jeder Molekel Nitrit geleisteten Umsatz, so ergibt sich, daß nach Dosen von 2—20 mg/kg jede Molekel Nitrit ein Äquivalent Hämoglobin oxydiert (s. Abb. 5, Kurve B). Wertet man als geleistete

Wirkung nicht den ganzen Umsatz, sondern nur die beobachtete maximale Hämiglobinkonzentration — was nicht ganz korrekt ist — so wird das Umsetzungsverhältnis kleiner gefunden und abhängig von der Dosis, was nach der Neigung der Kurve in Abb. 4 zu erwarten ist. Dann werden bei einer Dosis von 50 mg/kg nur 0,5 Äquivalente Hämoglobin von jedem Mol Nitrit oxydiert und bei 2 mg/kg 0,75 (s. Abb. 5, Kurve A).

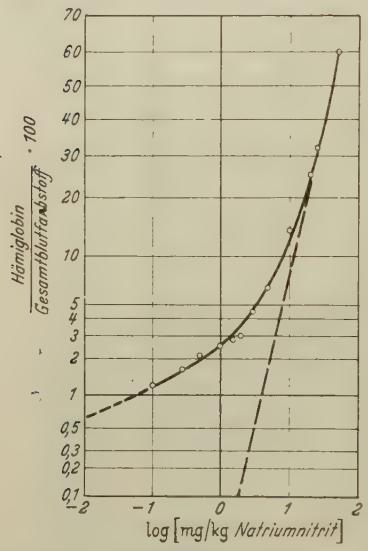


Abb. 6. Abhängigkeit der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration durch intravenös injiziertes Nitrit vom Logarithmus der Dosis dargestellt im Wahrscheinlichkeitsnetz.
——— durch die Meßergebnisse gelegte Kurve — — — Wahrscheinlichkeitsfunktion.

Das stoichiometrische Verhältnis von 1 Äquivalent Hämiglobin je Mol Nitrit wird zufällig errechnet als ein Mindestwert, und kann nicht als ein Beweis dafür gelten, daß jede Molekel Nitrit nur ein Häm oxydiert. Zunächst ist es sehr unwahrscheinlich, daß das gesamte injizierte Nitrit 2—3 Std im Blute bleibt bis es vom Hämoglobin quantitativ umgesetzt ist. Außerdem nimmt die Wirksamkeit des Nitrits mit Verringerung der Dosis nicht weiter ab nach $Hb\,^{III}_{max} = 0{,}20\ D^{0{,}9}$, sondern weit weniger. Dementsprechend steigt der von jeder Molekel Nitrit geleistete Mindestumsatz mit Abnahme der Dosis an (Abb. 5) und erreicht bei der Dosis von 0,1 mg/kg den Wert von 5 Äquivalenten Hämiglobin je Molekel Nitrit. Der Umsatz steht in diesem Dosenbereich zur Dosis in der Potenzbeziehung $U = 1{,}4 \cdot D^{-0{,}54}$ (U = Äquivalent Hämiglobin je Molekel Nitrit, D = mg/kg Natriumnitrit).

Die wesentlichen Ergebnisse unserer Untersuchungen der Hämiglobinbildung durch Nitrit im Tier zeigen, daß diese im Tier nicht den gleichen formalen Ablauf nimmt wie ihn REMMER[6] in vitro bei der Reaktion zwischen Hämoglobin, Sauerstoff und Nitrit fand. Wäre der „autokatalytische" Reaktionsverlauf beherrschend, dann sollte mit Verminderung der Dosis die maximale Hämiglobinkonzentration immer später erreicht werden. Würde das Maximum der Hämiglobinkonzentration in dem oben erwähnten Sinne durch die Hämiglobinreduktion oder die Elimination des Nitrits mit Abnahme der Dosis weiter vorgerückt, dann wäre bei autokatalytischem Verlauf eine sehr starke Abnahme der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration mit der Dosis zu erwarten. Das Gegenteil ist der Fall.

Der formale Ablauf der Hämiglobinbildung durch Nitrit in vivo erscheint ganz ähnlich dem durch Phenylhydroxylamin[7]. Ob und wieweit dieser Ähnlichkeit des formalen Ablaufs auch eine Ähnlichkeit im Mechanismus der Gesamtreaktion entspricht, soll später mit der Beschreibung der Untersuchung der einzelnen Teilreaktionen erörtert werden. Ein wesentlicher Unterschied besteht freilich in der Wirksamkeit der beiden Gifte, die in beiden Phasen (Dosen mit Wirkungsstärken über 0,5 g Hämiglobin/100 ml und Dosen mit geringeren Wirkungsstärken) beim Nitrit wesentlich geringer ist.

In Übereinstimmung mit der des Phenylhydroxylamins ist auch die Dosis-Wirkungsfunktion des Nitrits nicht durch eine Wahrscheinlichkeitsfunktion auszudrücken. Abb. 6 zeigt die Dosis-Wirkungsfunktion des Nitrits im Wahrscheinlichkeitsnetz und läßt die starke Abweichung unschwer erkennen.

Versuche.

a) Methoden.

Die Versuche wurden an Hunden durchgeführt. Natriumnitrit wurde in isotoner Natriumchloridlösung gelöst im Laufe von 1—$1^1/_2$ min intravenös injiziert. Die Methoden zur Bestimmung von Hämiglobin und Gesamtblutfarbstoff waren die gleichen wie bei den in der I. Mitteilung[7] beschriebenen Versuchen.

b) Ergebnisse.

Die nach Dosen von 0,1—100 mg/kg gemessenen Erhöhungen der Hämiglobinkonzentration und die je 100 ml Blut gebildete Menge Hämiglobin sind in der Tabelle 1 als Mittel der angegebenen Zahl von Versuchen zusammengestellt. Mit mehreren Dosen wurden nur jeweils 2 Versuche durchgeführt. Wir haben darum die Streuung nicht angegeben. Durch die Zahl der Dosen wird der Verlauf der beschriebenen Funktionen hinreichend genau festgelegt. Die Dosis von 0,1 mg/kg erhöht die Hämiglobinkonzentration auf etwa das Doppelte der normalen Hämiglobinkonzentration. Wir haben auch noch die Wirkung kleinerer Dosen gemessen. Wahrscheinlich bilden auch diese noch Hämiglobin, doch macht die Streuung zur quantitativen Bestimmung dieser Wirkung eine sehr große Zahl von Messungen notwendig.

In unseren Untersuchungen mit Phenylhydroxylamin und Nitrit fiel eine größere Zahl von Messungen des normalen Hämiglobin- und Gesamtblutfarbstoffgehalts der 12 für die Untersuchungen verwandten Hunde an. Der Gesamtblutfarbstoffgehalt betrug im Mittel 15,0 $\pm$ 0,1 g/100 ml Blut, die Streuung der Einzelwerte $\sigma = 1{,}8$ g/100 ml Blut. Der Hämiglobingehalt wurde im Mittel zu 0,12 $\pm$ 0,006 g/100 ml Blut

Tabelle 1. *Höchste Hämiglobinkonzentration und gebildete Hämiglobinmenge im Hunde nach intravenöser Injektion von Natriumnitrit in Dosen von 0,1—100 mg/kg.*

Zahl der Versuche	Dosis Natriumnitrit mg/kg	Natriumnitritkonzentration Mol/l Blut	Maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration		Gebildete Hämiglobinmenge			Höchste Hb^{III}-Konzentration Minuten nach der Injektion
			g/100 ml Blut	% des Gesamtblutfarbstoffs	g/100 ml Blut	Äquivalent l/Blut	Äq Hb^{III} / Mol Nitrit	
2*	100	$1{,}8 \cdot 10^{-2}$	12,5	91				
2*	50	$9{,}0 \cdot 10^{-3}$	8,5	60				
4**	25	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	5,0	32				
3	20	$3{,}6 \cdot 10^{-3}$	3,9	25	7,8	$4{,}6 \cdot 10^{-3}$	1,2	35
2	10	$1{,}8 \cdot 10^{-3}$	2,1	14	3,5	$2{,}1 \cdot 10^{-3}$	1,1	20
2	5	$9 \cdot 10^{-4}$	1,0	6,5	1,6	$9{,}5 \cdot 10^{-4}$	1,1	15
2	3	$5{,}4 \cdot 10^{-4}$	0,6	4,5	1,0	$5{,}9 \cdot 10^{-4}$	1,1	20
2	2	$3{,}6 \cdot 10^{-4}$	0,5	3,0	0,6	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	1,0	10
2	1,5	$2{,}7 \cdot 10^{-4}$	0,41	2,8	0,55	$3{,}2 \cdot 10^{-4}$	1,2	10
5	1,0	$1{,}8 \cdot 10^{-4}$	0,40	2,5	0,45	$2{,}6 \cdot 10^{-4}$	1,4	10
2	0,5	$9 \cdot 10^{-5}$	0,30	2,2	0,3	$1{,}8 \cdot 10^{-4}$	2,0	8
2	0,3	$5{,}4 \cdot 10^{-5}$	0,23	1,7	0,23	$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	2,5	11
10	0,1	$1{,}8 \cdot 10^{-5}$	0,15	1,2	0,15	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$	5,0	10

* In diesen Versuchen wurde Toluidinblau intravenös injiziert bevor die höchste Hämiglobinkonzentration mit Sicherheit erreicht war.

** Messungen von KIESE und ZÜRCHER [9].

gefunden, die Streuung der Einzelwerte $\sigma = 0{,}052$ g/100 ml. Der Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff betrug 0,8%. Frühere Untersuchungen[11] mit der gleichen Methode hatten für eine kleinere Zahl von Messungen einen mittleren Hämiglobingehalt von 0,12 g/100 ml Blut entsprechend 0,9% des Gesamtblutfarbstoffs ergeben.

Zusammenfassung.

Der Ablauf der Hämiglobinbildung nach intravenöser Injektion von Natriumnitrit und die Abhängigkeit der Wirkungsstärke und -größe des Nitrits von der Dosis wurden am Hunde untersucht.

Wie bei der Wirkung des Phenylhydroxylamins folgte der Anstieg der Hämiglobinkonzentration nicht einer einfachen Reaktionsordnung. Die Zunahme des gesamten gebildeten Hämiglobins klang jedoch annähernd exponentiell ab.

Die Wirkungsstärke (Erhöhung der Hämiglobinkonzentration) war für Dosen über 1 mg/kg eine Potenzfunktion der Dosis $W_s = 0{,}2 \cdot D^{0{,}9}$ g Hämiglobin je 100 ml Blut, bzw. $W_{s,r} = 1{,}6 \cdot D^{0{,}95}$ % des Gesamtblutfarbstoffs. Die je 100 ml Blut gebildete Menge Hämiglobin war der

[11] HEUBNER, W., M. KIESE, M. STUHLMANN u. W. SCHWARTZKOPFF: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 313 (1947).

Dosis proportional nach $W_g = 0{,}3\ D$ g Hämiglobin je 100 ml Blut. Für Dosen unter 1 mg/kg wich die Wirkung von diesen Funktionen ab. Die Wirkungsstärke war dann $W_{s,r} = 2{,}5 \cdot D^{0{,}32}$ und die Wirkungsgröße $W_g = 0{,}4 \cdot D^{0{,}4}$.

Nach Dosen über 2 mg/kg bildete jede Molekel Nitrit im Mittel 1 Äquivalent Hämiglobin. Mit Verringerung der Dosis nahm die mittlere Wirksamkeit der einzelnen Molekel zu und betrug bei Dosen von 0,1 mg 5 Äquivalente Hämiglobin je Molekel Nitrit.

Der normale Hämiglobingehalt der für die Untersuchungen verwandten Hunde betrug $0{,}12 \pm 0{,}006$ g/100 ml Blut, die Streuung der Einzelwerte $\sigma = 0{,}052$. Der Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff war 0,8%.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 446—458 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Zur Toxizität neuer Süßstoffe (1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzole).

Von

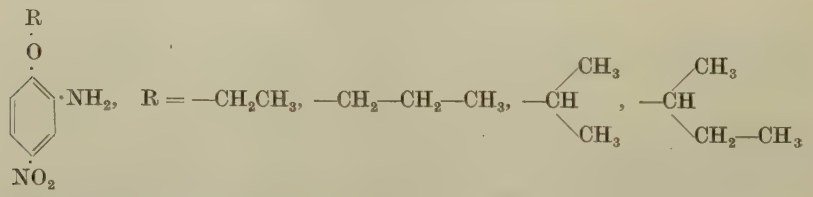
MANFRED KIESE.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. März 1949.)

BLANKSMA und VAN DER WEYDEN[1] stellten 1940 Alkoxyderivate des m-Nitranilins dar, unter denen sie 2 Äther fanden, die viel süßer sind als das m-Nitranilin[2], nämlich das 1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol und das 1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol. Dieses wurde 4000mal und jenes 1400mal süßer als Rohrzucker beschrieben. Beide Stoffe haben neben der starken Süßwirkung auch lokalanästhetische Wirkung[3]. Der Propyläther dürfte neben dem Steviosid, das 300mal süßer als Saccharin, also 120000mal süßer als Rohrzucker sein soll[4], der süßeste aller bekannten Süßstoffe sein. Andere m-Nitranilinderivate haben ebenfalls Süßwirkung, aber weit schwächere. Eine Übersicht über Chemie und Süßwirkung dieser Gruppe von Verbindungen hat kürzlich MAASS[5] gegeben.

Da nach dem Kriege ein großer Bedarf an praktisch brauchbaren Süßstoffen vorhanden war, haben wir pharmakologische Untersuchungen mit dem Äthyl-, n-Propyl-, Isopropyl und sekundärem Butyläther des 1-Oxy-2-amino-4-nitrobenzols durchgeführt. Die Struktur der Verbindungen ist in untenstehender Formel dargestellt:



Einige orientierende Untersuchungen wurden auch mit einem weiteren stark süßen Nitrobenzolderivat durchgeführt, dem N-4-Nitrophenyl-N′-(ω-carboxypropyl)-Harnstoff (Suosan),

[1] BLANKSMA, J. J., u. P. W. M. VAN DER WEYDEN: Rec. Trav. chim. Pays-Bas **59**, 629 (1940). — [2] MUSPRATT, J. T., u. A. W. HOFFMANN: Liebigs Ann. **57**, 218 (1846). — [3] VERKADE, P. E., C. P. VAN DIJK u. W. MEERBURG: Proc. nederl. Akad. Wetensch. **45**, 630 (1942). — [4] LEMAIRE, E.: Ind. chim. **35**, 46 (1948). — Ang. Chem. A **60**, 287 (1948). — [5] MAASS, H.: Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **44**, 50, 73 (1948).

das PETERSEN[6] dargestellt hat. Da die Verbindung nur sehr schwach wirksam ist, konnte mit der verfügbaren Menge eine systematische Prüfung nicht durchgeführt werden.

Versuche.

a) Methoden.

Der sekundäre Butyläther lag als gelbbraune Flüssigkeit vor, die andern Äther als gelbe Kristalle. Die Löslichkeit in Wasser von Zimmertemperatur war gering und betrug 100—300 mg je Liter. Der Butyläther war mit Olivenöl mischbar, die andern zu etwa 40 g/l darin bei Zimmertemperatur löslich. Alle Verbindungen waren kochbeständig. Das Suosan war sowohl in Wasser wie in Öl schlecht löslich. Gut löslich in Wasser war sein Natriumsalz, dessen Lösung für die Versuche verwandt wurde.

Die Süßwirkung wurde mit wäßrigen Lösungen durch Vergleich mit 1- und 5%igen wäßrigen Rohrzuckerlösungen von 6 Versuchspersonen bestimmt.

Die mittlere tödliche Dosis (DL_0) wurde an Ratten von 140—180 g Gewicht gemessen. Die Äther wurden in Öl gelöst, das Suosan als Natriumsalz in Wasser gelöst intraperitoneal injiziert. Nach einigen orientierenden Dosen erhielten 2 Gruppen von je 25 Tieren Dosen, die etwa 25 bzw. 75% der Tiere töteten. Die mittlere tödliche Dosis wurde dann im HAZENschen Wahrscheinlichkeitsnetz[7] nach der 2-Punktmethode bestimmt[8].

Untersuchungen über die Wirkung einmaliger großer Dosen wurden an Ratten, Katzen und Hunden durchgeführt. Die Gifte wurden in öliger Lösung subkutan oder intraperitoneal injiziert, den Hunden auch in einer Mehlaufkochung suspendiert durch die Schlundsonde in den Magen gegeben. Wirkungen täglicher kleinerer Dosen wurden an Ratten und Hunden untersucht. Diese erhielten die Gifte in Mehlabkochungen durch die Schlundsonde, jene in öliger Lösung durch die Schlundsonde oder intraperitoneal injiziert. Die Ratten wurden mit Küchenresten, Fischmehl und Hafer gefüttert, die Hunde mit Küchenresten und Rindfleisch. Die Ratten erhielten wöchentlich einmal Lebertran mit dem Futter.

Im Verlauf der Versuche wurden in geeigneten Zeitabständen Blutuntersuchungen durchgeführt. Gemessen wurden die Konzentrationen an Hämoglobin und Hämiglobin im Blute nach den Methoden von

[6] PETERSEN, S.: Ang. Chem. **60**, 58 (1948). — [7] HAZEN, A.: Trans. Amer. Soc. civ. Engrs. **77**, 1539 (1914). — [8] PRIGGE, R., u. W. SCHÄFER: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 281 (1939).

HAVEMANN, JUNG und ISSEKUTZ[9] oder von KIESE[10], an Verdoglobin nach der Methode von KIESE[11], sowie der Zahl der roten Zellen mit Heinzkörpern nach Vitalfärbung mit Nilblau oder Brillantkresylblau.

Bei Hunden wurde auch die Bilirubinkonzentration im Serum nach der Methode von HIJMANS VAN DEN BERGH gemessen. Ferner wurde der Harn auf Eiweiß, Zucker und Gallenfarbstoffe geprüft. Nach Beendigung der Versuche wurden die Organe histologisch untersucht.

b) Ergebnisse.

1. Mittlere tödliche Dosis (DL_{50}).

Nach der intraperitonealen Injektion der für die Bestimmung der mittleren tödlichen Dosis erforderlichen Mengen von 300—800 mg/kg wurde bei den Ratten eine schnell eintretende narkotische Wirkung beobachtet. Den schnellsten Wirkungseintritt und die kürzeste Narkosedauer zeigte der Äthyläther. 5 min nach der Injektion von 400 mg/kg und bereits 2—3 min nach der von 500 mg/kg befanden sich die Tiere in Seitenlage. Die überlebenden Tiere wachten nach wenigen Stunden wieder auf. Die Propyläther hatten längerdauernde narkotische Wirkung als der Äthyläther, und zwar hielt die Wirkung des Isopropyläthers länger an als die des n-Propyläthers. Nach einer Dosis von 700 mg/kg war die Hälfte der Tiere noch nach 24 Std in Narkose und tödliche Wirkungen traten noch zwischen 24 und 36 Std ein. Der Butyläther wirkte noch länger als der Isopropyläther. Noch 40 Std nach der Injektion wurden Todesfälle beobachtet. Die mittleren tödlichen Dosen der Gifte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Tabelle enthält auch eine annähernde mittlere tödliche Dosis des Suosans. Zum Vergleich ist die unter gleichen Bedingungen bestimmte mittlere tödliche Dosis eines stark wirksamen Nitrobenzols, des m-Dinitrobenzols, angegeben.

Hunde wurden durch Gaben von 500 mg/kg der Äther in den Magen nicht getötet. Ein Hund überlebte 3 solcher Dosen. Ein Hund starb

Tabelle 1. *Mittlere tödliche Dosis* (DL_{50}) *von 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzolen, Suosan und m-Dinitrobenzol für Ratten bei intraperitonealer Injektion.*

Gift	DL_{50} mg/kg
1. 1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol	360±13
2. 1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol	470±10
3. 1-Isopropoxy-2-amino-4-nitrobenzol	560±22
4. 1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol	660±10
5. Suosan	~1000
6. m-Dinitrobenzol	28±0,5

[9] HAVEMANN, R., F. JUNG u. B. v. ISSEKUTZ jr.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). [10] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 190 (1947). — [11] KIESE, M.: Klin. Wschr. **1942**, 565.

$1^1/_2$ Tage nach der subkutanen Injektion von 400 mg/kg Butyläther. Katzen ertrugen subkutane Injektion von 330 mg/kg des Butyläthers; durch intraperitoneale Injektion der gleichen Dosis wurde eine Katze getötet. 1100 mg/kg Butyläther und nach 9 Tagen 500 mg/kg Äthyläther in den Magen gegeben waren für eine Katze nicht tödlich, obgleich bei der zweiten Dosis die durch die erste bewirkte Anämie noch nicht geschwunden war (s. unten Tabelle 3).

2. Die Süßwirkung.

Die Aminonitrophenoläther hatten keinen rein süßen Geschmack, sondern daneben einen waldmeisterartigen Geschmack. In hohen Konzentrationen war der Geschmack zunächst stechend, der süße Geschmack wurde erst nach kurzdauernder Einwirkung wahrgenommen. Das war auch bei verdünnten Lösungen der Fall. Nach längerer Einwirkung anästhesierten die Äther die Zungenschleimhaut. Dem Suosan fehlte der Beigeschmack. Die Stärke der Süßwirkungen verglichen mit der von Rohrzuckerlösungen wechselte mit der Konzentration. Sie war relativ größer in niederen Konzentrationen, die mit 1%iger Zuckerlösung verglichen wurden als in höheren, die 5%iger Zuckerlösung in der Süßwirkung gleich waren. In der Tabelle 2 ist angegeben, wieviel mal stärker die Süßwirkung ist als 5- bzw. 1%ige Rohrzuckerlösung. Zum Vergleich ist die Wirkungsstärke des Saccharins und des Dulcins ebenfalls angeführt.

Tabelle 2. *Süßwirkung von 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzolen und Suosan bezogen auf 5- bzw. 1%ige Rohrzuckerlösung.*

Die niederen Zahlen beziehen sich auf den Vergleich mit 5%iger Zuckerlösung.

	Süßwirkung
Rohrzucker	1
1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol	2500—4000
1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol	700—1400
1-Isopropoxy-2-amino-4-nitrobenzol	500—1000
1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol	300—500
Suosan	200—300
Saccharin	450
Dulcin	200

3. Andere Wirkungen großer Dosen.

Bei der Beschreibung der mittleren tödlichen Dosen wurde schon die *narkotische Wirkung* der Äther auf Ratten erwähnt. Diese Wirkung ist auch bei Katzen nachweisbar, doch ist sie nicht so stark, und die Tiere zeigen oft eine Reflexübererregbarkeit. Die Äther senkten die *Körpertemperatur* der Katzen sehr stark. Dosen von 300 mg/kg Butyläther verminderten die Temperatur in 2—3 Std auf 30—28°.

Die Tiere wurden darum meist durch Bestrahlung erwärmt. Hunde verhielten sich ähnlich wie Katzen. Nach Gaben von 500 mg/kg in den Magen nahmen sie Seitenlage ein, waren aber nicht in tiefer Narkose. Dosen über 300 mg/kg bewirkten bei Hunden und Katzen nach Gabe in den Magen sehr oft Erbrechen, gelegentlich auch nach subkutaner Injektion; häufiger nach Gabe des Butyläthers als der anderen. Die gleichen Dosen vermehrten bei Katzen den *Speichelfluß* stark.

An Katzen und Hunden, weniger an Ratten, waren nach einmaligen großen Dosen der Äther *Wirkungen auf die roten Zellen* nachweisbar. Bald nach der Gabe von 0,3—1,0 g/kg der Äther stieg im Laufe einiger Stunden die Hämiglobinkonzentration um einige Gramm je 100 ml Blut an, erreichte nach 6—18 Std ihre Höchstwerte und sank im Laufe von 24—72 Std wieder auf normale Werte ab. Die Wirkungsstärke der untersuchten Äther war nicht sehr verschieden. Katzen waren empfindlicher als Hunde. Bildung von Verdoglobin wurde weder bei Katzen noch bei Hunden beobachtet. An den roten Zellen traten Heinzkörper auf, bei Katzen mehr als bei Hunden. Ihre Zahl erreichte nach 1—3 Tagen den Höchstwert. Im Laufe von 2—7 Tagen nach der Gabe eines Äthers nahm die Blutfarbstoffkonzentration in den meisten Versuchen um einige Gramm je 100 ml ab. Die wesentlichen Ergebnisse einer Reihe von Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt und der Ablauf einer starken Wirkung an einer Katze ist in

Tabelle 3. *Wirkungen von 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzolen auf das Blut von Katzen und Hunden.*

Versuch Nr.	Tier	kg	Gift	Dosis* g/kg	Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration um g/100 ml	in Tagen	Zunahme der Hb(3)-Konzentration um g/100 ml	Dauer der Erhöhung der Hb(3)-Konzentration über die Norm in Stunden	Heinzkörper Prozent der roten Zellen
1	Hund	9,7	1-sek. Butoxy.	0,55 p. o.	—	—	0,5	36	3
2	Hund		1-Äthoxy.	0,5 p. o.	2,0	2	4,0	48	2
3	Hund		1-Propoxy.	0,5 p. o.	—	—	1,5	24	4
4	Hund	6,1	1-sek. Butoxy.	0,55 p. o.	2,0	3	1,8	36	2
5	Hund	12,2	1-sek. Butoxy.	0,4 s.k.	2,3	2	1,0		0,5**
6	Katze	3,5	1-sek. Butoxy.	0,33 s.k.	5,0	6	5,0	36	20
7	Katze		1-sek. Butoxy.	0,33 s.k.	6,8	5	5,1	60	6
8	Katze	3,5	1-sek. Butoxy.	0,33 i. p.	4,2	1/3	1,8		8***
9	Katze	3,4	1-sek. Butoxy.	1,1 p. o.	5,6	7	6,7	72	55
10	Katze		1-Äthoxy.	0,5 p. o.	—	—	3,5	24	6
11	Katze		1-Propoxy.	0,1 i.p.	—	—	1,2	36	8
12	Katze	2,9	1-Äthoxy.	0,1 i.p.	—	—	2,5	36	5

* p. o. = per os, s.k. = subkutan, i.p. = intraperitoneal.
** Tod nach $1^1/_2$ Tagen. — *** Tod nach 8 Std.

Abb. 1 wiedergegeben. Eine genauere Differenzierung der Wirkungsstärke der verschiedenen Äther wird in einer folgenden Untersuchung durchgeführt[12]. Im Blut von Ratten bewirkten Dosen von 200 und 300 mg/kg des Äthyläthers, intraperitoneal injiziert, nur geringere Veränderungen der Blutfarbstoff- und Hämiglobinkonzentration als bei Hunden und Katzen oder gar keine.

Im Serum der Hunde war die Konzentration des Bilirubins durch die Wirkung der Äther nicht erhöht. Im Harn wurde nur einmal (Versuch 5, Tabelle 3) einen Tag nach der subkutanen Injektion von 400 mg/kg des Butyläthers eine Dimethylaminobenzaldehydreaktion beobachtet. Die Farbe des Harns war intensiv gelb bis braun.

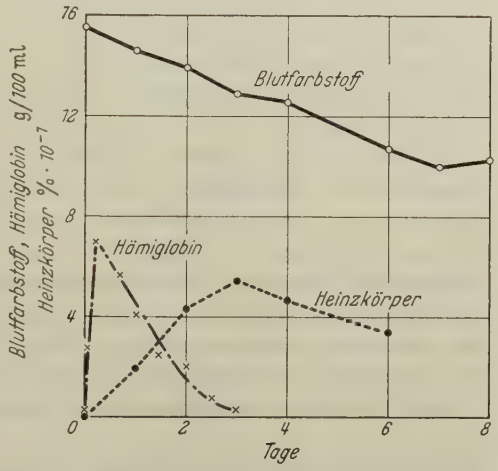


Abb. 1. Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration, Erhöhung des Hämiglobingehaltes des Blutes und Bildung von Heinzkörpern bei der Katze durch 1,1 gkg 1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol per os.

Die *histologische Untersuchung* der Organe des durch den Butyläther getöteten Hundes (Versuch 5, Tabelle 3) ließ an Lungen, Herz, Milz und Niere keine pathologischen Veränderungen erkennen. Die Kapillaren der Leber waren strotzend mit Blut gefüllt, die Zentren vieler Läppchen bildeten Blutseen, in denen stark atrophierte Leberbalken lagen. Die Epithelien waren herdförmig geringgradig feintropfig verfettet. An den Organen der 8 Std nach intraperitonealer Injektion von 330 mg/kg Butyläther (Versuch 8, Tabelle 3) verstorbenen Katze waren pathologische Veränderungen nicht nachzuweisen.

4. Chronische Einwirkung.

a) Versuche mit Ratten. Zur Prüfung der langdauernden Einwirkung der Äther auf Ratten wurde 4 Gruppen von je 10 Tieren mit ähnlichem Gewicht täglich 1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol, und zwar in Dosen von 50, 100 und 200 mg/kg intraperitoneal sowie 300 mg/kg per os (durch die Schlundsonde in den Magen) gegeben. Zwei weitere Gruppen von je 10 Tieren erhielten täglich 300 mg/kg 1-Sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol, die eine intraperitoneal und die andere per os. Eine Gruppe

[12] Kiese, M., u. K. Ranniger: In Vorbereitung.

von 20 Tieren wurde zur Kontrolle unter gleichen Bedingungen wie die Versuchstiere gehalten; von diesen starben 2 aus ungeklärter Ursache. Von den Versuchstieren verloren wir mehrere durch Zwischenfälle bei der Herzpunktion oder bei der Sondierung. Solche Verluste wurden in den ersten beiden Wochen nach Versuchsbeginn durch neue Tiere ersetzt. Ausgewertet wurden nur Versuche, in denen der Tod des Tieres sicher nicht durch diese Operationen bedingt war.

Lebensdauer der Tiere nach Beginn der Gabe der Gifte, Änderung des Tiergewichtes und der Blutfarbstoffkonzentration im Blute sowie die Zahl der roten Zellen mit Heinzkörpern sind in Tabelle 4 niedergelegt. Die angegebenen Werte sind die Mittel der betreffenden Gruppen; der Lebensdauer ist auch die Streuung des Mittels hinzugefügt.

Alle angewandten Dosen töteten die Tiere. Die *mittlere Lebensdauer*, auch der am längsten lebenden Tiergruppe, war weit niedriger als die Lebensdauer unbehandelter Tiere. Immerhin ertrugen die Tiere sehr große tägliche Dosen (300 mg/kg) des Äthyläthers und Butyläthers 288 bzw. 115 Tage. Intraperitoneal verabreicht waren die Äther erheblich stärker wirksam als vom Magen-Darmkanal aus. Gemessen an der Lebensdauer entsprach die Wirkungsstärke von 300 mg/kg per os etwa der von 50 mg/kg intraperitoneal. Ebenfalls gemessen an der Lebensdauer war der Butyläther wirksamer als der Äthyläther.

Mit Ausnahme von 3 Tieren der Gruppe 2 hatten alle Tiere zu Versuchsbeginn ein *Gewicht* unter 200 g. In den Gruppen 2, 3 und 6 war das Wachstum der Tiere gehemmt, in Gruppe 6 verloren die Tiere im Mittel sogar Gewicht. Das Wachstum der anderen Gruppen blieb ebenfalls hinter dem der Kontrolltiere zurück, doch waren die Tierzahlen zu klein, so daß der Unterschied kleiner als die Streuung des Mittels war. Nur in der ersten Gruppe nahm der mittlere *Hämoglobingehalt* der jungen Tiere ein wenig zu, in allen anderen Gruppen ab. Auch in dieser Wirkung nahm im Mittel die Wirkungsstärke mit der Dosis zu, doch war die Streuung für eine quantitative Auswertung zu groß und die Tierzahlen zu klein. Eine Erhöhung der *Hämiglobinkonzentration* war bei vielen Tieren nachweisbar, aber gering und überstieg nie 1 g/100 ml. Der Anteil der *roten Zellen mit Heinzkörpern* überstieg nicht 5% und war im Laufe der langen Versuche sehr wechselnd.

Die *histologische Untersuchung* von Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere der gestorbenen Tiere zeigte Veränderungen vornehmlich an der *Leber* auf. In der letzten Spalte der Tabelle 4 ist die Zahl der Tiere angegeben, bei denen das histologische Bild der Leber von der Norm abwich. Die Stärke der Veränderung ist durch + bis +++ angedeutet. Im allgemeinen waren die Veränderungen gering und bestanden in Atrophie der Balken, geringer Dissoziation der Zellen, gröberer Körnelung des Zellplasmas, geringgradiger Verfettung oder Quellung der Endothelien.

Tabelle 4. *Mittlere Lebensdauer, Änderung des Gewichtes und der Blutfarbstoffkonzentration von Ratten, die täglich Äthoxy- bzw. Butoxyaminonitrobenzol erhielten.*

Tiergruppe	Zahl der Tiere	Gift	Tägliche Dosis mg/kg	Lebensdauer in Tagen	Gewicht in Gramm Beginn → Ende	Änderung der Blutfarbstoffkonzentration um g/100 ml	Heinzkörper in Prozent der roten Zellen	Zahl der Tiere mit histologischen Veränderungen der Leber
1	7	1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol	300 p. o.	228±31	132→177	+1,0	1—2	1 (+)
2	6		200 i. p.	141±8	190→190	—4,8	3—5	2 (+)
3	6		100 i. p.	182±11	158→185	—2,5	2—4	1 (++)
4	5		50 i. p.	210±21	121→190	—0,9	1—2	2 (+)
5	8	1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol	300 p. o.	115±10	111→161	—0,8	1—2	3 (+)
6	10		300 i. p.	51±10	157→144	—2,7	2—4	1 (+++) 1 (++) 3 (+)

Nur bei je einem Tier der Gruppen 3 und 6 war die Atrophie und die periphere Verfettung der Läppchen stärkeren Grades. Die Leber eines Tieres der Gruppe 6 wies starke degenerative Veränderungen auf: herdförmige hochgradige Atrophie der Balken, teils pyknotische teils gequollene ungleich färbbare Zellkerne. In mehreren Lebern war der Eisengehalt der Endothelien vermehrt.

Von den andern untersuchten Organen ist lediglich ein größerer Eisengehalt der meisten Milzen und eine (fragliche) Vergröberung der Plasmakörnung (trübe Schwellung) der Epithelien der Nieren je eines Tieres der Gruppen 3, 5 und 6 zu vermerken.

β) Versuche mit Hunden. Wegen der beschränkten Menge von Äthern und der großen erforderlichen Dosen konnte die chronische Einwirkung des Äthyl-, Propyl- und sekundären Butyläthers auf Hunde nur an je einem Tier untersucht werden. Die Tiere erhielten zunächst jeden Tag 300 mg/kg durch die Schlundsonde in den Magen. Die Gabe der Gifte wurde bei 2 Tieren für einige Tage unterbrochen, als Krämpfe auftraten. Für den mit dem Propyläther behandelten Hund mußte die Dosis nach einer Woche auf 150 mg/kg vermindert werden. In Tabelle 5 ist die Versuchsdauer, das Gewicht und die Hämoglobinkonzentration zu Beginn und zu Ende der Versuche sowie die mittlere Zahl der roten Zellen mit Heinzkörpern angegeben. Eine kurze Beschreibung des Verlaufs der einzelnen Versuche sei hier noch hinzugefügt.

1. 1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol 300 mg/kg per os. Hund 7,1 kg. Gelegentlich kurz nach der Gabe des Giftes in den Magen oder nach mehreren Stunden Erbrechen. In den ersten 5 Monaten keinerlei Störungen. Das Gewicht nahm in dieser Zeit von 7,1 kg auf 8 kg zu und der Gehalt des Blutes an Blut-

Tabelle 5. *Lebensdauer, Änderung des Gewichts und der Blutfarbstoffkonzentration von Hunden, die täglich 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzole erhielten.*

Hund Nr.	Gewicht kg	Gift	Tägliche Dosis mg/kg	Lebensdauer in Tagen	Änderung des Gewichts kg	Änderung der Blutfarbstoffkonzentration um g/100 ml	Heinzkörper in Prozent der roten Zellen
1	7,1	1-Äthoxy-2-amino-4-ntirobenzol	300 p. o.	198	— 1,4	— 4,5	1—2
2	10,0	1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol	300 p. o. später 150 p. o.	>137	0	+ 1	0,3—1
3	7,0	1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol	300 p. o.	93	— 1,8	— 7,4	0,5—1

farbstoff von 13 auf 14 g/100 ml. Danach nahmen Gewicht und Blutfarbstoffkonzentration bis zum Tode stetig ab, diese auf 8,5 g/100 ml, jenes auf 5,7 kg.

Heinzkörper wurden ganz vereinzelt bereits mehrere Tage nach Versuchsbeginn an roten Zellen beobachtet. Ihre Zahl stieg im Laufe von 4 Wochen auf 1—2% der roten Zellen an und bewegte sich weiterhin in diesem Bereich. Der Hämiglobingehalt des Blutes nahm allmählich auf 1—1,5 g/100 ml zu und hielt sich ebenfalls in diesen Grenzen. Der Bilirubingehalt des Serums wurde nur einmal zu 0,4 mg/100 ml gefunden, in allen anderen Messungen zwischen 0,2 und 0,3 mg/100 ml (letzte Messung 7 Tage vor dem Tode). Im Harn wurde gegen Ende des Versuchs wiederholt eine schwache Trübung des Harns nach Kochen und Ansäuren mit Essigsäure beobachtet. Die Dimethylaminobenzaldehydreaktion fiel in der Kälte nie positiv aus. Nach dem 198. Versuchstag starb der Hund plötzlich in der Nacht.

2. 1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol 300 bzw. 150 mg/kg per os. Hund 10,0 kg. Am 7. Tage nach Beginn des Versuchs mit einer täglichen Dosis von 300 mg/kg traten plötzlich Krämpfe auf, die etwa 1 Std anhielten. Der Beginn der Krämpfe war nicht beobachtet worden. Ein anderer Hund, der sich im gleichen Zwinger befand, biß inzwischen dem krampfenden Tier ein großes Stück Muskulatur aus dem linken Hinterbein. Die Dosis des Propyläthers wurde auf 150 mg/kg verringert, und vom 10.—20. Tage die Giftgabe ganz unterbrochen. Die Bißwunde heilte inzwischen unter einfachen Verbänden gut. Vom 21. Tage an wurden wieder täglich 150 mg/kg des Propyläthers verabreicht. Nach dem 70. Versuchstag traten an einzelnen Tagen wenige Stunden nach der Verabreichung des Giftes wieder kurze leichte Krämpfe oder steifer Gang auf. Die Giftgabe wurde nicht unterbrochen. Später (nach etwa 100 Tagen) wurden solche Störungen nicht mehr beobachtet. Am 137. Tage mußte der Versuch mangels Gift beendet werden. Der Hund wurde durch Äthernarkose getötet. Das Gewicht des Tieres blieb während des ganzen Versuchs, mit kleinen Schwankungen, gleich. Die Blutfarbstoffkonzentration sank in den ersten 3 Wochen von 14 auf 12,5 g/100 ml ab und stieg danach langsam auf 15 g/100 ml an. Die Hämiglobinkonzentration erreichte am 7. Tage 1,2 g/100 ml und wurde später zwischen 0,5 und 1,0 g/100 ml gefunden. Der Bilirubingehalt des Serums überstieg nicht 0,3 mg/100 ml. Heinzkörper waren an 0,3—1% der roten Zellen vorhanden. Im Harn war nie eine Vermehrung von Proteinen, Zucker oder Gallenfarbstoffen nachzuweisen. Seine Farbe war intensiv gelb.

3. 1-sek. Butoxy-2-amino-4-nitrobenzol 300 mg/kg per os. Hund 7,0 kg. Häufiger als nach der Gabe der anderen Äther wurde im Beginn des Versuches

erbrochen. Die ersten Störungen des Allgemeinzustandes wurden nach einer Woche beobachtet. Der Hund fraß schlecht und lag still und teilnahmslos in der Ecke. Die Giftgabe wurde für 3 Tage unterbrochen. Danach war der Hund wieder munterer und freßlustiger. Am 36. Tage konnte der Hund nicht mehr stehen und fraß nicht mehr; am nächsten Tage Seitenlage und Krämpfe. Die Giftgabe wurde wieder unterbrochen und am 44. Tage wieder fortgesetzt, nachdem der Zustand des Hundes wieder gebessert war. In der Folgezeit blieb der Zustand des Tieres befriedigend. Am 93. Tage wurde der Hund morgens in Seitenlage gefunden, nachdem er am Vortage noch recht munter gewesen war, und starb am Vormittag. Innerhalb der ersten 4 Wochen nahm das Gewicht des Hundes von 7 auf 5 kg ab und blieb weiterhin auf diesem Wert. Die Blutfarbstoffkonzentration sank ziemlich stetig von 15,0 auf 7,8 g/100 ml. Die Zahl der roten Zellen mit Heinzkörpern war gering und wurde nie über 1% der roten Zellen gefunden. Die Hämiglobinkonzentration war 1—2 g/100 ml, in der letzten kurz vor dem Tode durch Herzpunktion entnommenen Blutprobe 2,5 g/100 ml. Der Bilirubingehalt des Serums betrug bis zum 83. Versuchstag nie über 0,5 mg/100 ml, in der am letzten Tage entnommenen Blutprobe 8,2 mg/100 ml. Im Urin, dessen Farbe zunächst dunkelbraun und später etwas heller war, war seit dem 8. Versuchstag wiederholt eine geringe Proteinvermehrung mit der Kochprobe nachweisbar. Der am letzten Tage durch Blasenpunktion entnommene Urin enthielt etwa 0,5% Protein.

Die *histologische Untersuchung* der Organe der Hunde ergab morphologische Veränderungen der *Leber* und *Nieren*. Am stärksten waren diese in der Leber des Hundes Nr. 1. In den Schnitten waren nur vereinzelt intakte Läppchen zu finden. Die meisten Läppchen wiesen verschieden stark entwickelte im Zentrum beginnende Nekrosen auf, die von wuchernden Endothelien durchsetzt waren. Die Epithelien der Läppchenperipherie waren atrophisch, in wechselndem Grade verfettet, die Endothelien geschwollen und zum Teil abgeschilfert. In Abb. 2 ist ein Übersichtsbild wiedergegeben, das die Nekrosen erkennen läßt. Die Epithelien der Niere waren trüb und zum Teil abgeschilfert. In den Glomeruli und Tubuli waren Eiweißausscheidungen vorhanden. Die Epithelien der Leber des Hundes Nr. 2 waren groß und von wabiger pflanzenähnlicher Struktur. Die Epithelien der Niere waren leicht getrübt; in den Tubuli geringe Eiweißausscheidungen. Die Zellbalken der Leber des Hundes Nr. 3 waren atrophisch und diffus feintropfig verfettet, die Endothelien geschwollen, die perikapillären Räume erweitert, die intraepithelialen Gallenkapillaren mit braunem Pigment erfüllt. Die Nierenepithelien enthielten ebenfalls braunes Pigment (Butyläther). In den Tubuli geringe Eiweißausscheidungen. Im Interstitium Zellinfiltrate. Die Endothelien der Milz und Leber aller 3 Tiere waren überladen mit Eisen.

c) Besprechung.

Die pharmakologische Wirksamkeit der 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzole ist im Vergleich zu der vieler anderer Amino- und Nitrobenzole gering. In der tödlichen Wirkung auf Ratten ist ihnen eins der stärkst

wirksamen Nitrobenzole, das m-Dinitrobenzol, um das 10—20fache überlegen. Die Wirkungen auf die roten Zellen (Hämiglobinbildung, Heinzkörperbildung) sind ebenfalls viel schwächer als die vieler anderer einfacher Amino- und Nitrobenzole[13, 14, 15], insbesondere des m-Nitroanilins[15] und des 1-Methyl-2-amino-4-nitrobenzols[16]. Die Art und Dauer der beobachteten Auswirkungen auf Zentralnervensystem, Blut und Leber beweist, daß sie sich im Organismus grundsätzlich den wirksameren

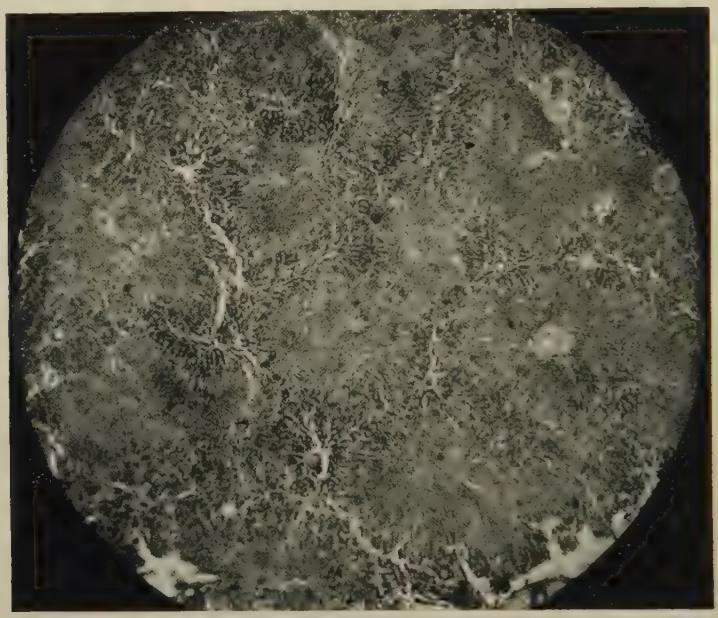


Abb. 2. Zahlreiche Läppchennekrosen in der Leber eines Hundes, der 198 Tage lang täglich 300 mg/kg 1-Äthoxy-2-amino-4-nitrobenzol erhalten hatte. Mikrophotographie.

Amino- und Nitrobenzolen von ähnlicher Struktur ähnlich verhalten. Als besondere Wirkung ist die narkotische Wirkung auf Ratten zu erwähnen, die wohl der Ätherеigenschaft zuzuschreiben ist und die zur Geltung kommt, da die anderen Wirkungen verhältnismäßig schwach sind. Größe und Struktur des Alkyls haben bei den untersuchten Verbindungen keinen Einfluß auf den Charakter der Wirkung, wohl aber auf das Verhältnis der Stärke der verschiedenen Wirkungen eines Giftes Während der Propyl- und Äthyläther in der tödlichen Wirkung ein. maliger Dosen auf Ratten und der Süßwirkung den sekundären Butyläther übertreffen, ist dieser bei chronischer Einwirkung wirksamer-

[13] HEUBNER, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [14] BREDOW, M. v., u. F. JUNG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 335 (1942). — [15] JUNG, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 113 (1947). — [16] REITER, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **205**, 327 (1948).

Wahrscheinlich ist die längere Wirkungsdauer des Butyläthers, die an der narkotischen Wirkung auf Ratten gut erkennbar ist, an der Verstärkung der Wirksamkeit bei chronischer Einwirkung mitbeteiligt.

Wie andere Nitrobenzole, z. B. Trinitrotoluol[17] und Dinitrobenzol[18], schädigen die 1-Alkoxy-2-amino-4-nitrobenzole auch das Zentralnervensystem, die Leber, und in geringem Maße die Nieren. Nicht nach einmaligen großen Dosen, wohl aber unter der langdauernden Einwirkung kleiner Dosen traten bei den Hunden Krämpfe auf, wie sie auch durch Dinitrobenzol und Trinitrotoluol bewirkt werden. Unter den 42 Ratten, die durch die chronische Einwirkung der Gifte starben, waren bei 3 Tieren stärkere und bei 11 Tieren weitere geringgradige degenerative Veränderungen der Leber nachweisbar. Bei den Hunden waren Veränderungen der Leber noch regelmäßiger und in einem Falle von katastrophalem Ausmaß. Über die Entwicklung dieser Veränderungen sind auf Grund unserer Versuche keine Aussagen möglich. Wie in früheren Untersuchungen über Dinitrobenzol[19] und Trinitrotoluol[20] bestand auch hier eine große Diskrepanz zwischen den morphologischen Veränderungen und der Funktion der Leber. Der Hund Nr. 1, der in seiner Leber kaum noch ein Läppchen besaß, das nicht zum Teil nekrotisch war, hatte bei einer Vergiftungsdauer von 198 Tagen noch 7 Tage vor dem Tode Bilirubin in einer Konzentration von nur 0,2 mg in 100 ml im Serum und lief noch 12 Std vor dem Tode umher, während der Hund Nr. 3 bei weit geringeren morphologischen Veränderungen 8,2 mg/100 ml Bilirubin im Serum hatte. Eine sichere quantitative Differenzierung der Wirkung der einzelnen Äther auf die Leber ist durch unsere Versuche noch nicht möglich, doch scheint der Butyläther wirksamer zu sein als der Äthyläther, da er in der halben Einwirkungszeit mindestens ebenso häufig Leberschädigungen bewirkte wie der Äthyläther.

Es wurde oben erwähnt, daß die untersuchten Gifte wegen ihrer starken Süßwirkung großes Interesse gefunden haben. Vornehmlich der Propyläther wird bereits in großem Umfange als Süßstoff für Nahrungs- und Genußmittel verwendet. Da die Äther neben der Süßwirkung auch solche haben, die bei Zugabe zu einem Nahrungs- oder Genußmittel durchaus nicht erwünscht erscheinen, erhebt sich die Frage, ob diese Wirkungen bei der Verwendung dieser Stoffe als Süßstoffe zu erwarten sind. Verbraucht ein Mensch für seinen Süßbedarf 200 g Rohrzucker am Tage, so bräuchte er zur Deckung des ganzen Bedarfs durch den Propyl- oder Äthyläther 0,05—0,3 g dieser Süßstoffe,

[17] Voegtlin, C., C. W. Hooper u. J. M. Johnson: Hygienic Lab. Bull. **126**, 7 (1920). — [18] Kiese, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 361, 505 (1949). — [19] Kiese, M., u. G. Siems: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 528 (1949). — [20] Kiese, M., u. G. Siems: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 546 (1949).

d. h. (für einen erwachsenen Menschen von 70 kg) 0,7—4 mg/kg. Wenn der Mensch nicht ganz außergewöhnlich empfindlich für diese Gifte ist, erscheint es unwahrscheinlich, daß diese Dosen selbst bei regelmäßiger Aufnahme über längere Zeit nennenswerte Schäden verursachen. Immerhin erscheint es notwendig die Unschädlichkeit der kleinen Dosen auch bei jahrelanger Einwirkung experimentell zu prüfen, da weder der Mechanismus z. B. der Wirkung auf die Leber bekannt ist, noch unsere bisherigen Kenntnisse über die Abgängigkeit der Wirkung von der Dosis ausreichen, um in experimentell nicht untersuchte Gebiete zu extrapolieren, wie uns Untersuchungen mit dem Phenylhydroxylamin gezeigt haben, einem Gift, das gerade im Wirkungsmechanismus der Amino- und Nitrobenzole eine wichtige Rolle spielt[21].

Fräulein Ellen Thau habe ich für ihre Hilfe bei den Untersuchungen zu danken.

Zusammenfassung.

Die mittlere tödliche Dosis (DL_{50}) des Propyl-, Äthyl-, Isopropyl- und sekundären Butyläthers des 1-Oxy-2-amino-4-nitrobenzols beträgt 360, 470, 560 bzw. 660 mg/kg; sie ist wesentlich größer als die stark wirksamer Nitrobenzole, z. B. des m-Dinitrobenzols (28 mg/kg).

Der Propyläther hat die stärkste Süßwirkung und ist 2500—4000mal stärker wirksam als Rohrzucker. Der Äthyläther ist 700—1000mal stärker wirksam als Rohrzucker.

Große Dosen der Äther haben, besonders auf Ratten, narkotische Wirkung. Sie oxydieren einen geringen Teil des Hämoglobins zu Hämiglobin, bilden Heinzkörper an den roten Zellen und bewirken eine Anämie.

Tägliche Einwirkung von Dosen von 100—300 mg/kg auf Ratten und Hunde hemmt das Wachstum der Ratten, bewirkt bei Hunden spastische Lähmungen und Krämpfe, macht die Tiere anämisch, schädigt die Leberzellen bis zur Nekrose und tötet die Tiere, je nach Dosis und Applikationsart, in 50—230 Tagen. Der sekundäre Butyläther ist bei chronischer Einwirkung wirksamer als der Äthyläther.

Die Frage, ob bei fortdauernder Aufnahme dieser Süßstoffe durch den Menschen in Mengen, deren Süßkraft dem gewöhnlichen Zuckerverbrauch entspricht, schädliche Wirkungen zu befürchten sind, kann noch nicht mit Sicherheit verneint werden.

[21] Kiese, M., u. M. Soetbeer: Naunyn-Schmiedebergs **207**, 426 (1949).

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 459—467 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der ehemaligen Albertus-Universität Königsberg i. Pr. (Direktor: Prof. Dr. K. Zipf).

Zur Wirkung des Bromcholins.

Von

Karl Zipf und Günter Meiler.

(Eingegangen am 29. April 1949.)

Acetylcholin und andere labile Cholinester eignen sich wegen des raschen Abbaues durch die Cholinesterase nur wenig zur therapeutischen Anwendung. Sie besitzen bei intravenöser Injektion eine sehr flüchtige, stoßartige Wirkung, nicht selten mit störenden Nebenwirkungen. Bei subkutaner oder intramuskulärer Zufuhr wirken sie aus dem gleichen Grunde unsicher und sind deshalb schwer dosierbar. Im alkalischen Darminhalt wird Acetylcholin aber so schnell in Cholin und Essigsäure gespalten, daß eine resorptive Wirkung gar nicht zustande kommen kann. Lediglich bei intravenöser Dauerinfusion wäre eine länger anhaltende und gleichmäßige Wirkung ohne störende Nebenwirkungen zu erwarten. Die stabilen Cholinester, welche durch Cholinesterase oder Alkali entweder gar nicht oder nur langsam abgebaut werden, sind deshalb für therapeutische Zwecke besser brauchbar. Von diesen findet neben Carbaminoylcholin (Lentin, Doryl) und Acetyl-β-Methylcholin (Mecholyl) vor allem Bromcholin (wirksamer Bestandteil des Pacyls) praktische Anwendung.

Von therapeutischen Erwägungen ausgehend hat vor kurzem Oettel[1] die blutdrucksenkende und gefäßerweiternde Wirkung von Bromcholin und Acetylcholin miteinander verglichen. Vergleichende Untersuchungen über neue synthetische Cholinester gaben uns Gelegenheit, die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften des Bromcholins seit 1942 eingehend zu prüfen.

1. Wirkung am normalen Tier.

Schon die Prüfung am normalen Kalt- und Warmblüter ergab, daß Bromcholin ähnlich wie Carbaminoylcholin und Acetylcholin wirkt.

Dosen von 01,—0,2 mg je 40 g Frosch (R. temporaria) führen bei Injektion in den Brustlymphsack zu leichten Vergiftungserscheinungen, wie Bewegungsarmut und Verlangsamung der Atmung. 0,5 mg bewirken Steifheit der Extremitäten, Rückenlage, allgemeine motorische Lähmung und starke Verlangsamung der Atmung. Nach $1^1/_2$ Std haben sich die Tiere wieder erholt. Nach 1 mg treten rasch ähnliche

[1] Oettel, Hansjürgen: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 314 (1943).

Erscheinungen mit vollkommener Atemlähmung und Erholung nach mehreren Stunden auf. Die mittlere letale Dosis je Gramm Frosch beträgt 0,05 mg, wonach diastolischer Herzstillstand eintritt. Höhere Gaben von 5—20 mg wirken innerhalb weniger Stunden absolut tödlich. Neben Rückenlage, motorischer Lähmung und Atemstillstand wird dabei vollkommenes Erlöschen der Reflexe beobachtet.

An weißen Mäusen wurde die Bromcholinwirkung nach subkutaner, intravenöser und peroraler Zufuhr untersucht. Bei subkutaner Injektion wurde als mittlere letale Dosis 35 mg je Kilogramm Körpergewicht ermittelt. Bewegungsarmut, Muskelzittern, Lähmung der Extremitäten, tonisch-klonische Krämpfe, Salivation und krampfhafte Atmung waren die charakteristischen Erscheinungen. Ähnliche Wirkungen und gelegentlich auch die Straubsche Schwänzchenreaktion wurden bei intravenöser und peroraler Zufuhr beobachtet. Als mittlere letale Dosis (DL_{50}) wurden bei intravenöser Injektion 7,75 mg je Kilogramm und bei peroraler Zufuhr mit der Schlundsonde 625 mg je Kilogramm Maus gefunden. Vergleicht man die gefundenen Werte mit denen von Carbaminoylcholin und Acetylcholin (Tabelle 1), so reiht sich Bromcholin zwischen Acetylcholin und Carbaminoylcholin ein.

Tabelle 1. *Tödliche Dosen.*

	R.temporaria mg/g (Brust-lymphsack)	Weiße Maus, mg/kg		
		per os	subkutan	intravenös
Acetylcholin	0,5*	5500	550	12,5
		5000*	500*	17,5*
Carbaminoylcholin	0,005*	25	3,0	0,5
		25*	1,5*	0,5*
Bromcholin	0,05	625	35	7,75

* Werte nach Kreitmair[2].

Bei jeder Applikationsart wirkt Bromcholin auf die weiße Maus stärker als Acetylcholin, ist aber weniger toxisch als Carbaminoylcholin. Die kleinen Unterschiede zwischen den von Kreitmair[2] gefundenen und den eigenen Werten mögen dabei auf Verschiedenheiten im Tiermaterial und in der Injektionstechnik zurückzuführen sein. Für die vergleichende Bewertung sind sie ohne Belang. Besonders hervorzuheben ist, daß Bromcholin vor allem bei peroraler Zufuhr wesentlich wirksamer ist als Acetylcholin.

2. Blutdruckwirkung.

Es war von vornherein zu erwarten, daß Bromcholin an normalen Tieren blutdrucksenkend wirkt. Die depressorische Wirkung des Bromcholins hängt dabei außer von der Gabengröße von der Reaktionslage

[2] Kreitmair, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **164**, 346 (1932).

des Versuchstieres ab, auf welche die Tiefe der Narkose von wesentlichem Einfluß ist. Wie für Acetylcholin und Carbaminoylcholin ist deshalb die Empfindlichkeit der Versuchstiere für Bromcholin von Fall zu Fall verschieden.

In den meisten Fällen bewirken intravenöse Gaben von 0,005 bis 0,01 mg/kg Blutdrucksenkungen von 50—70 mm Hg. Kleinere Dosen wirken schwächer, höhere stä ker depressorisch. Bei besonders empfindlichen Tieren führen in Einzelfällen sogar 0,01—1 γ/kg zu erheblicher Blutdrucksenkung. Die blutdrucksenkende Wirkung des Bromcholins ist somit geringer als die von Acetylcholin und Carbaminoylcholin. Die Blutdrucksenkung hält länger an als diejenige von Acetylcholin, dauert aber weniger lange an als die Carbaminoylcholinwirkung. Auch in dieser Hinsicht nimmt Bromcholin eine Mittelstellung zwischen Acetylcholin und Carbaminoylcholin ein. Nach wiederholten mittleren Bromcholingaben kehrt der Blutdruck immer wieder zur Ausgangshöhe zurück. Fortgesetzte große Bromcholindosen führen jedoch zu allmählichem dauernden Absinken des Blutdrucks. Dosen von 0,1 mg/kg und höher verursachen stärkste Blutdrucksenkung, schwere Störungen der Herzaktion und führen unter Atemlähmung zum Tode.

In Abständen von 5—10 min wiederholte intravenöse Bromcholininjektionen (0,05 mg/kg) bewirken am gleichen Versuchstier (Katze) immer gleich starke Blutdrucksenkungen. Eine Wirkungsabnahme im Sinne der sog. Tachyphylaxie wird nicht beobachtet.

Atropin (0,5—1 mg/kg) hebt die depressorische Wirkung mittlerer Bromcholindosen für Stunden auf. Aber auch die blutdrucksenkende Wirkung hoher Bromcholindosen kann durch entsprechende Atropindosen aufgehoben werden.

Hohe Bromcholindosen — 0,5—1 mg/kg — wirken an der atropinisierten Katze, vor allem bei wiederholter Injektion, pressorisch. Durch 1 mg/kg Bromcholin wurde beispielsweise der Blutdruck der atropinisierten Katze in Numalnarkose um 70 mm Hg und mehr gesteigert. Der pressorischen Wirkung kann eine kurze und geringe initiale Senkung vorausgehen.

Auch am dekapitierten Tier wirkt Bromcholin, wenn auch schwächer als am Normaltier, blutdrucksenkend. Höhere Bromcholindosen haben jedoch eine rein pressorische Wirkung. Atropin verstärkt die blutdrucksteigernde Wirkung am dekapitierten Tier. 2 mg/kg Bromcholin steigerten beispielsweise vor der Atropinbehandlung den Blutdruck um 32 mm Hg, nach Atropininjektion (0,5 mg/kg) dagegen um 78 mm Hg. Die initiale Blutdrucksenkung bleibt bei der dekapitierten und atropinisierten Katze vollkommen aus.

Die pressorische Wirkung des Bromcholins am dekapitierten und atropinisierten Tier hat zweifellos dieselbe Genese wie die pressorische

Wirkung des Acetylcholins und Carbaminoylcholins[3–9]. Endogen gebildetes oder von außen zugeführtes Acetylcholin führt zu einer Freisetzung von Sympathin und zu Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren. Nach partieller oder totaler Ausschaltung des Parasympathikus wird die pressorische Adrenalinwirkung manifest.

Der Beweis dafür konnte erbracht werden durch Vorbehandlung mit Ergotamin. Eine Bromcholindosis von 0,01 mg/kg führte bei einer mit Numal narkotisierten Katze zu einer Blutdrucksenkung von 62 mm Hg. Nach Injektion von 0,5 mg/kg Atropin bewirkte 1 mg kg Bromcholin eine Blutdrucksteigerung von 42 mm Hg und mehr als 2 min Dauer. Die gleiche Bromcholindosis hatte nach Injektion von 1 mg/kg Ergotamin auf der Höhe der Blutdrucksteigerung eine Blutdrucksenkung von 36 mm Hg und 20 sec Dauer zur Folge. Eine nachfolgende Adrenalindosis von 0,001 mg/kg war ohne Wirkung. Die Wirkung klang nur langsam ab. Die pressorische Wirkung des Bromcholins erschien erst wieder nach erneuter Atropinzufuhr.

Die blutdrucksenkende Wirkung des Bromcholins tritt auch bei subkutaner Injektion auf. Die wirksamen Gaben liegen höher als bei intravenöser Zufuhr, die Wirkung hält aber länger an. Durch 0,1 bis 1 mg/kg Bromcholin wurde bei der Katze in Numalnarkose der Blutdruck um etwa maximal 25 mm Hg gesenkt. Die Wirkung begann nach wenigen Minuten und hielt 45 min bis über 2 Std an. Bei Versuchstieren mit hohem Ausgangsblutdruck ist die depressorische Wirkung subkutaner und intramuskulärer Bromcholingaben besonders markant.

Die Wirkung des Bromcholins auf den Blutdruck bei enteraler Zufuhr wurde ebenfalls an Katzen geprüft. Die Injektion der Bromcholinlösung geschah direkt in eine Dünndarmschlinge. Nach Injektion von 0,05 mg/kg Bromcholin sank der arterielle Blutdruck bereits nach 4 min um 10 mm Hg. Die depressorische Wirkung, die maximal etwa 60 mm Hg erreichte, hielt länger als 2 Std an. Höhere Gaben (0,1 mg/kg) senkten den Blutdruck stärker und länger anhaltend.

Die blutdrucksenkende Wirkung des Acetylcholins wird durch Bromcholin nicht verstärkt. Intravenöse Acetylcholingaben von

[3] Feldberg, W., u. B. Minz: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **163**, 66 (1931).
[4] Lombroso, K., u. A. Bonsignore: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **12**, 20 (1937). — Ber. Physiol. **100**, 664 (1937). — [5] Tournade, A., Ch. Sarrouy u. M. Chevillot: C. r. Soc. Biol. **124**, 100 (1937). — Ber. Physiol. **100**, 664 (1937). — [6] Hermann, H., F. Jourdan, G. Morin u. J. Vial.: C. r. Soc. Biol. **124**, 317 (1937). — Ber. Physiol. **101**, 174 (1937). — [7] Danielopolu, D., u. J. Marcou: C. r. Soc. Biol. **133**, 12 (1940). — J. Physiol. (Brit.) et Pathol. gen. **37**, 1290 (1940). — Ber. Physiol. **124**, 652 (1941). — [8] Lombroso, K., u. A. Bonsignore: Arch. Sci. biol. (It.) **23**, 22 (1937). — Ber. Physiol. **102**, 502. (1937) — [9] Feldberg, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **168**, 287 (1932).

0,001 mg/kg zeigten auch nach kurz vorhergehender Vorbehandlung mit 0,1—0,3 mg/kg Bromcholin immer dieselbe Blutdrucksenkung. Bromcholin hat demnach keinen nachweisbaren sensibilisierenden Einfluß auf die blutdrucksenkende Acetylcholinwirkung.

Dem entspricht, daß die Aktivität der Cholinesterase durch Bromcholin nur wenig beeinflußt wird. Versuche, welche in dankenswerter Weise von Herrn Prof. Ammon mit der von ihm angegebenen gasanalytischen Methode im Warburgapparat durchgeführt wurden, zeigten dies eindeutig. Die durch Menschenserum katalysierte Acetylcholinhydrolyse wurde durch 1 mg Bromcholin (je 2 cm^3 Trogflüssigkeit) gar nicht, durch 2 mg um 21% gehemmt. Bei Verwendung von Pferdeserum bewirkten 2 mg Bromcholin eine Hemmung von 20%. Zum Vergleich sei erwähnt, daß 0,001 mg Eserin die Acetylcholinspaltung unter den gleichen Bedingungen noch vollständig hemmt, während 1 mg Carbaminoylcholin eine Hemmung von 53% bewirkt[10, 11].

3. Herzwirkung.

Bereits im Blutdruckversuch an der Katze konnte festgestellt werden, daß hohe Bromcholindosen die Herztätigkeit im Sinne der Vaguserregung beeinflussen. Zum gleichen Ergebnis führten Versuche am isolierten Froschherzen (R. temporaria), die mittels einer von Zipf angegebenen Durchströmungskanüle mit offenem und geschlossenem Kreislauf vorgenommen wurden.

Die erste Wirkung wird bei Durchströmung mit einer Bromcholinkonzentration $5 \cdot 10^{-4}$ beobachtet und äußert sich in einer geringen Abnahme der Amplitudenhöhe. Deutlicher wird die Wirkung bei einer Konzentration $3 \cdot 10^{-4}$. Zur leichten negativ inotropen Wirkung tritt eine geringgradige Bradykardie. Manchmal geht der negativ inotropen Wirkung eine kurze positiv inotrope Phase voraus. Gelegentlich wird auch eine flüchtige Frequenzzunahme beobachtet. Höhere Konzentrationen — $2 \cdot 10^{-4}$ bis 10^{-4} — führen zu markanter Bradykardie, negativ inotroper Wirkung und Überleitungsstörungen. Die Vorhöfe schlagen im alten Rhythmus, dagegen fehlen einzelne oder mehrere Kammerkontraktionen, es kommt zu Gruppenbildung und schließlich bleibt das Herz in Diastole stehen. Atropin hebt sämtliche Bromcholinwirkungen vollständig auf oder verhindert sie. Unter Durchströmung mit normaler Ringerlösung kehrt rasch die normale Herzaktion wieder zurück. Bromcholin wirkt demnach auf das Kaltblüterherz in gleicher Weise wie Acetylcholin und Carbaminoylcholin.

[10] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934). — [11] Ammon, R.: Erg. Enzymforsch. **9**, 35 (1943).

4. Gefäßwirkung.

Die blutdrucksenkende Wirkung des Acetylcholins wird von den meisten Untersuchern[12–18] als Folge einer peripheren Gefäßerweiterung angesehen. Neuerdings bringt allerdings Gotsev[19] die Blutdruckänderungen nach intravenöser Injektion von Acetylcholin in direktem Zusammenhang mit den Änderungen der Herztätigkeit. Er lehnt vor allem eine Vasodilatation im Splanchnikusgefäßgebiet als Ursache der arteriellen Blutdrucksenkung ab. Demgegenüber scheint die gefäßerweiternde Wirkung des Acetylcholins und anderer Cholinester durchaus sicher zu stehen. Die Beziehungen zwischen Gefäßerweiterung auf Reizung cholinergischer Nerven und Freisetzung von Acetylcholin, die Bildung von Acetylcholin bei der reaktiven und Arbeitshyperämie, das Freiwerden acetylcholinähnlicher Substanzen bei lokalen Gefäßerweiterungen und die vasodilatatorischen Reaktionen bei Durchströmung isolierter Organe mit acetylcholinhaltigen Lösungen lassen sich in diesem Zusammenhang nicht übergehen. Außerdem läßt sich zeigen, daß sowohl Acetylcholin als auch Carbaminoylcholin bei intravenöser Injektion oder Dauerinfusion geeigneter Mengen und Konzentrationen den arteriellen Blutdruck stark senken, ohne daß die Herzaktion überhaupt oder wesentlich verändert wird. Ähnliche Befunde stammen von Tournade und Chardon[20]. Im gleichen Sinne spricht die antagonistische Wirkung des Acetylcholins gegenüber der konstriktorischen Wirkung des Adrenalins[21]. Auch das von Gotsev beobachtete gleichartige Verhalten des Milz- und Nierenvolumens bei blutdrucksenkender und pressorischer Acetylcholinwirkung läßt nicht den allgemeinen Schluß zu, daß die Blutdrucksenkung nur durch verminderte Herztätigkeit hervorgerufen wird. Sie bestätigt höchstens, daß Acetylcholin beim normalen und atropinisierten Tier zu Ausschüttung von Adrenalin oder Freisetzung von Sympathin führt. Vom Adrenalin ist aber bekannt, daß es das Milz-, Nieren- und Darmvolumen vermindert. Schließlich darf auch das Verhalten der übrigen Gefäßgebiete (Muskulatur, Haut) nicht vernachlässigt werden. Selbstverständlich kann bei Verwendung von Acetylcholindosen, welche extreme Bradykardie oder gar vorübergehenden Herzstillstand bewirken, eine Verminderung der Herztätigkeit am Absinken des arteriellen Blutdruckes mitbeteiligt sein.

---

[12] Dale, H. H.: J. Pharmacol. (Am.) **6**, 147 (1914). — [13] Mott, F. W., u. W. D. Halliburton: J. Physiol. (Brit.) **21**, 18 (1897). — [14] Halliburton, W. D.: Erg. Physiol. **4**, 65 (1905). — [15] Dale, H. H., u. A. N. Richards: J. Physiol. (Brit.) **52**, 110 (1918). — [16] Hartmann, Evans u. Walker: Amer. J. Physiol. **90**, 668 (1929). — [17] Braun, W., u. W. Richards jr.: J. Physiol. (Brit.) **66**, 371 (1928). — [18] Ueda, K.: Jap. J. Obstetr. **14**, 225 (1931). — [19] Gotsev, T.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **181**, 207 (1926). — [20] Tournade, A., u. G. Chardon: C. r. Soc. Biol. **131**, 95 (1939). — [21] Danielopolu, D., u. J. Marcou: C. r. Soc. Biol. **131**, 21 (1939).

Kleine Gaben von Bromcholin, die den Blutdruck in markanter Weise (um 30—50 mm Hg) senken, verändern die Herzaktion entweder gar nicht oder lösen nur eine kurzdauernde Bradykardie aus. Es muß deshalb angenommen werden, daß auch die depressorische Wirkung des Bromcholins im wesentlichen auf peripherer Gefäßerweiterung beruht. Direkt konnte diese am durchströmten, isolierten Gefäßapparat des Kalt- und Warmblüters nachgewiesen werden.

Am Läwen-Trendelenburgschen Froschgefäßpräparat mit Tyrodedurchströmung ist entsprechend den Beobachtungen mit Acetylcholin und anderen Cholinestern die Wirkung nicht immer eindeutig. Am sichersten tritt die gefäßerweiternde Wirkung bei Injektion von 1 cm^3 Bromcholinlösung in der Konzentration 10^{-3} bis 10^{-4} in die Zufuhrwege auf.

Besonders deutlich äußert sich der gefäßerweiternde Effekt bei Adrenalindauerdurchströmung des Gefäßpräparates. Hierbei wirken Bromcholinkonzentrationen im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-4} gefäßerweiternd.

Am durchströmten Kaninchenohr nach Krawkow-Pissemsky, führt Dauerdurchströmung mit einer Bromcholinkonzentration von 10^{-5} zu vorübergehender deutlicher Gefäßerweiterung. Bei Adrenalindauerdurchströmung der Gefäßpräparate bewirken Einzelinjektionen von je 1 cm^3 Bromcholinlösung 10^{-5} bis 10^{-4} Gefäßerweiterung.

Sowohl am Froschgefäßpräparat als auch am durchströmten Kaninchenohr verursachen vor allem höhere Bromcholinkonzentrationen — 10^{-3} bis 10^{-2} — gelegentlich Gefäßverengerung. Auch darin unterscheidet sich Bromcholin nicht von Acetylcholin[22–26].

5. Wirkung auf Darm und Uterus.

Der isolierte Dünndarm des Kaninchens wird durch Bromcholin erregt. Die rhythmischen Bewegungen werden verstärkt und vermehrt, der Tonus der glatten Muskulatur wird gesteigert. Empfindliche Darmstücke sprechen bereits auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ an. Im allgemeinen bewegten sich die wirksamen Grenzkonzentrationen zwischen 10^{-7} und $5 \cdot 10^{-5}$. Bei einer Konzentration von 10^{-6} war die Wirkung meist optimal. Die Verstärkung der Kontraktionen und die Tonussteigerung werden durch Atropin prompt aufgehoben.

Durch etwa dieselben Konzentrationen von Bromcholin wird auch der isolierte Meerschweinchenuterus erregt. Auch diese Wirkung wird durch Atropin verhindert.

[22] Müsch, H. J., u. C. Cüppers: Pflügers Arch. **244**, 50 (1940). — [23] Brecht, K.: Pflügers Arch. **243**, 714 (1940). — [24] Danielopolu, D., u. J. Marcou: C. r. Soc. Biol. **131**, 21 (1939). — [25] Euler, U. S. v.: J. Physiol. (Brit.) **74**, 271 (1932); **93**, 129 (1938). — [26] Ueda, K.: Jap. J. Obstetr. **14**, 225 (1931).

6. Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur.

Zu der einer Reizung parasympathischer Nerven entsprechenden, muskarinartigen Wirkung gesellen sich bei Acetylcholin und anderen Cholinestern noch sog. nikotinartige Wirkungen. Hierher gehört neben der Gefäßverengerung, Blutdrucksteigerung und Frequenzzunahme des Herzens die Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur.

An dem als Testobjekt besonders geeigneten Rectus abdominis des Frosches bewirkten Acetylcholin und Carbaminoylcholin eine langsam verlaufende Kontraktur.

Die gleiche Wirkung besitzt auch Bromcholin. Je nach der Empfindlichkeit des Präparates führen Konzentrationen 10^{-7} bis $5 \cdot 10^{-5}$ nach einer gewissen Latenzzeit zu Kontraktur. Maximale Wirkung wird durch Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-4}$ erreicht. Die Kontrakturwirkung des Bromcholins am Rectus abdominis wird durch Eserin (10^{-5}) auch bei längerer Vorbehandlung nicht verstärkt. Das bestätigt die Ergebnisse von Ammon, daß Bromcholin auch in hoher Konzentration die Aktivität der Cholinesterase nur wenig hemmt. Kontrollversuche ergaben, daß dieselbe Eserinkonzentration die Acetylcholinkontraktur 3—4mal verstärkt.

In hohen Konzentrationen wirken durch Eserin stabilisiertes Acetylcholin oder stabile Cholinester stark hemmend auf die motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur[27]. Sie wirken demnach kurareartig. Am intakten Frosch (R. temporaria) ließ sich zeigen, daß hohe Gaben von Bromcholin ebenfalls kuraresierend wirken. Die Injektion von 5 mg Bromcholin in den Brustlymphsack von Fröschen führte nach 45—50 min zu vollkommener oder partieller Blockade gegenüber Reizung vom N. ischiadicus aus. Die direkte Muskelerregbarkeit blieb dagegen erhalten. Zum gleichen Ergebnis führten Versuche in der klassischen Versuchsanordnung von Claude Bernard und Köl-liker. Durch Injektion von 4—10 mg Bromcholin je Frosch trat am normal durchbluteten Bein Blockade ein. Dagegen ändert sich am zirkulatorisch ausgeschalteten Bein die indirekte Erregbarkeit nicht. Wegen der hohen Stabilität des Bromcholins tritt die kurareähnliche Wirkung auch ohne Eserinvorbehandlung auf.

7. Besprechung der Ergebnisse.

Die allgemeinen und spezifischen Wirkungen des Bromcholins decken sich vollständig mit denen des Acetylcholins und Carbaminoylcholins. Unterschiede bestehen nur in quantitativer Hinsicht. Sie beruhen jedoch nicht allein auf der verschiedenen chemischen Stabilität der Cholinester. Denn Carbaminoylcholin und Bromcholin, die praktisch

[27] Schaefer, H.: Elektrophysiologie, Bd. I, S. 374. Wien: Franz Deuticke 1940.

von der Cholinesterase nicht hydrolysiert werden, zeigen quantitativ wesentlich verschiedene Wirkungen.

Hinsichtlich allgemeiner und spezifischer Wirkungen steht Bromcholin zwischen Acetylcholin und Carbaminoylcholin. Von den spezifischen Wirkungen sind die Blutdrucksenkung, die negativ chrono- und inotrope Herzwirkung, die periphere Gefäßerweiterung und die erregende Wirkung auf Darm und Uterus „muskarinähnlich", also echt parasympathikomimetisch und damit durch Atropin ausschaltbar. Von allen diesen Wirkungen läßt sich die periphere Gefäßerweiterung am isolierten Gefäßpräparat des Kalt- und Warmblüters nicht regelmäßig nachweisen. Gleiche Erfahrungen liegen auch für Acetylcholin und andere Cholinester vor. Das Auftreten einer gefäßerweiternden oder gefäßverengenden Wirkung hängt anscheinend von einer bestimmten Tonuslage und Ansprechbarkeit der Gefäße ab. Dafür spricht unter anderem die leichtere Auslösbarkeit vasodilatatorischer Reaktionen durch Cholinester bei Dauerdurchströmung mit stark verdünnten Adrenalinlösungen.

Auch in seinen „nikotinartigen" Wirkungen unterscheidet sich Bromcholin nicht von den typischen Cholinestern. Die vollständige Übereinstimmung der grundsätzlichen Wirkungen wird schließlich durch den Nachweis der kurareartigen Wirkung des Bromcholins bestätigt.

Zusammenfassung.

1. Bromcholin besitzt alle typischen Wirkungen des Acetylcholins. Es senkt den arteriellen Blutdruck durch periphere Gefäßerweiterung, beeinflußt das Herz im Sinne der Vaguserregung und wirkt erregend auf die glatte Muskulatur von Darm und Uterus. Am quergestreiften Froschmuskel führt Bromcholin zu Kontraktur. Hohe Dosen lähmen den Muskel kurareartig.

2. Die muskarinartigen Wirkungen werden durch Atropin aufgehoben oder verhindert. — Die nikotinartigen Wirkungen beruhen zum Teil auf Adrenalinausschüttung oder Freisetzung von Sympathin.

3. Bromcholin ist weniger allgemeingiftig als Carbaminoylcholin, aber toxischer als Acetylcholin.

4. Bromcholin wird durch Cholinesterase praktisch nicht gespalten, hemmt das Ferment nicht und sensibilisiert die Erfolgsorgane nicht für Acetylcholin.

5. Bromcholin wird bei enteraler Zufuhr rasch resorbiert. Der arterielle Blutdruck erfährt dabei eine anhaltende Senkung.

Prof. K. Zipf, (13b) Kempten i. Allgäu, Reichsstr. 2.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 468—476 (1949).

Aus dem Institut für animalische Physiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. K. Wezler).

Zur Frage der Adrenalinumkehr durch Sekalealkaloide.

Von

Wilhelm Schroeder, Leopold Ther und Karl Wezler.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am *8. April 1949.)*

Durch spezielle Hydrierung des Lysergsäureanteils der Mutterkornalkaloide (Stoll und Hofmann[1]) lassen sich kristallisierte Dihydroalkaloide gewinnen. Eines von diesen, das Dihydroergotamin (DHE 45) ist von Rothlin[2] eingehend pharmakologisch untersucht worden und hat sich hierbei im Vergleich zum genuinen Stammkörper als *wesentlich verschieden* erwiesen. Von besonderem Interesse, vor allem für die Therapie, ist seine Wirkung auf den Blutkreislauf. Während Ergotamin den Blutdruck bei intravenöser Injektion mehr oder weniger stark erhöht, wird er durch DHE 45 in allen wirksamen Dosen und bei allen untersuchten Tierarten *in Narkose* (Kaninchen, Katze, Hund) gesenkt. Der Effekt einer fördernden Adrenalindosis wird an der narkotisierten Katze eventuell schon in Dosen von 0,01 mg/kg aufgehoben bzw. umgekehrt. Diese erstmalig von Sollmann und Brown[3] 1905 beobachtete Erscheinung, daß Mutterkornextrakte die Wirkung des Adrenalins am Blutdruck hemmen, ist von Rothlin[2] bekanntlich dahin erweitert worden, daß Mutterkornalkaloide nicht nur, wie Dale[4] angenommen hat, jene Funktionen hemmen, welche durch Reizung sympathischer Nerven oder durch Adrenalin gefördert werden, sondern auch in solchen Fällen sympathikolytische Wirkung aufweisen, in denen das Adrenalin erschlaffend auf die Muskulatur einwirkt. Das quantitative Erfassen der Adrenalinhemmung bzw. Umkehr ist für die genuinen wie dihydrierten Alkaloide wegen der großen individuellen Schwankungen und der langen Dauer der Wirkung erschwert. Nach Rothlin[2] gelingt es nur bei Anwendung sehr geringer Dosen an ein und demselben Tier mehr als einen Hemmungsversuch durchzuführen; die vergleichende Untersuchung an demselben Tier soll dann exakte Werte liefern. Nach Rothlin[2] ist sicher, daß bei der Katze in Urethannarkose die Adrenalinumkehr sowohl am Blutdruck als auch an Organgefäßen mit DHE 45 *regelmäßig und in geringeren Dosen* erzielt werden kann als mit Ergotamin. Im Gegensatz zur Wirkung am Gesamttier in Narkose, wo Ergotamin Steigerung, DHE 45 hingegen in allen wirksamen Dosen nur Senkung

auslöst, bewirkt an der Spinalkatze mit künstlicher Atmung nicht nur das Ergotamin, sondern auch das DHE 45 eine Blutdruckerhöhung. Für diese Diskrepanz macht Rothlin nicht die Narkose verantwortlich, denn am *Leersum*-Kaninchen mit und ohne Narkose senkt DHE 45 den Blutdruck. Die Ursache soll darin liegen, daß bei der Spinalkatze alle zentralnervösen Hemmungsmechanismen ausgeschaltet sind und beim Gesamttier die Blutdrucksenkung nach DHE 45 im wesentlichen durch die Beeinflussung zentraler Gefäßtonusmechanismen zustande kommt. Dafür spricht auch der Nachweis, daß sowohl die genuinen als auch die dihydrierten Alkaloide am Herz-Lungenpräparat nach Starling, also am nicht innervierten Herzen, in pharmako-therapeutischen Dosen die Leistung des Herzens nicht verändern.

Um auch am Menschen die Kreislaufwirkung hydrierter Mutterkornalkaloide zu analysieren, haben Bluntschli und Götz[5] Versuche mit DHE 45 und Dihydroergocornin unter anderen Versuchspersonen auch an Patienten durchgeführt, an denen die Sympathektomie an einer oder mehreren Extremitäten durchgeführt worden war. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl dem DHE 45 als auch dem Ergotamin 2 Komponenten der Mutterkornalkaloidwirkung zukommen, und zwar einmal eine direkt konstriktorische Wirkung auf glattmuskelige Organe, und andererseits eine vasodilatatorische, die auf einer Sympathikushemmung beruht. Der Wirkungsmechanismus dieser beiden Mutterkornpräparate ist an normal innervierten Gliedmaßen aber deshalb nicht zu analysieren, weil die Wirkung auf einer Interferenz der sich wechselseitig beeinflussenden Funktionen Vasodilatation und Vasokonstriktion beruht. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß nach Sympathektomie sowohl beim Ergotamin als auch beim DHE 45 nur eine vasokonstriktorische Wirkung nachgewiesen werden kann. Die sympathikolytische (vasodilatatorische) Komponente ist von der Unversehrtheit der sympathischen Bahnen abhängig und auch das DHE 45 ist nach Bluntschli und Götz[5] kein Mutterkornpräparat mit *rein sympathikolytischer Wirkung,* wie es von verschiedenen Forschern ursprünglich behauptet wurde.

Die vorliegenden Untersuchungen galten zunächst der Frage, in welcher Weise DHE 45 in geringen, nicht toxischen Dosen am *nicht narkotisierten Tier* den Kreislauf beeinflußt und ob sich diese Wirkung *wesentlich* von der des Ergotamins unterscheidet. Im Vordergrund des Interesses stand dabei die Frage, ob DHE 45 die Blutdruckwirkung einer Adrenalininjektion auch am nicht narkotisierten Tier in gleicher Weise wie in Narkose modifiziert, zumal nach Untersuchungen von Rothlin der Narkose kein bedeutender Einfluß auf die Umkehrwirkung zukommen soll.

Die Versuche wurden an 18—20 kg schweren Hunden mit operativ angelegter Karotisschlinge vorgenommen. Am nicht narkotisierten Tier wurde fortlaufend

sowohl der Blutdruck an der Karotisschlinge als auch die Pulswellengeschwindigkeit am Aorta-Iliakarohr nach einer Methode von W. Schroeder[6] registriert. Die Injektionen erfolgten durch eine Vene des Vorderbeines. Sowohl das Ergotamin (Gynergen), als auch das DHE 45 wurden in einer Dosis von 0,012–0,05 mg/kg jeweils in 5,0 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung gelöst langsam ($^1/_2$ min) intravenös injiziert. Das Adrenalin wurde in einer Dosierung von 1—1,5 γ/kg (in einer Lösung von 1:100000) innerhalb von 6—8 sec vor der Injektion der Sekalealkaloide und in der 2., 12., 32. und 62. min danach injiziert. Insgesamt wurden 12 Versuche an 4 Hunden durchgeführt.

Das *Ergotamin* allein entsprach in seiner Wirkung den Ergebnissen früherer Untersucher (s. auch Steinmann[7]). In unseren Versuchen stieg der *Blutdruck* entsprechend der Dosierung, und zwar diastolisch stärker (20—40 mm Hg) als systolisch (16—32 mm Hg). Gleichzeitig erhöhte sich die *Pulswellengeschwindigkeit* um 1—1,5 m/sec und die *Frequenz sank* um 24—48 Schläge je Minute. Diese Zahlen lassen die *Abnahme des Minutenvolumens* sowie die *Zunahme des peripheren Widerstandes* erkennen.

In 4 Versuchen (vgl. hierzu die Abb. 1—4 und Tabelle 1) wurde die blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins durch Ergotamin im Durchschnitt um 18% (bezogen auf den mittleren Blutdruck) zusätzlich verstärkt. Während der Blutdruck durch Adrenalin nach dem Zusatz von Gynergen *immer* eine weitere Erhöhung erfährt, verhalten sich Pulswellengeschwindigkeit, peripherer Widerstand und Minutenvolumen nicht regelmäßig. Die Reaktion dieser Kreislaufgrößen ist von der gewählten Adrenalinmenge und von der Gynergendosis abhängig. Die Frequenzsteigerung nach der Adrenalininjektion war in der Regel vor dem Ergotaminzusatz stärker als nach dem Ergotaminzusatz. Bei der Betrachtung der Blutdruckkurven nach Ergotamin (Abb. 4) fiel das Fehlen der depressorischen Wellen sowie der Vaguspulse auf. Erst 30—60 min nach der Ergotamininjektion traten die Gegenregulationen wieder in Erscheinung, wie sie in Abb. 3 zu sehen sind.

Auch mit DHE 45 wurden am nicht narkotisierten Hund Ergebnisse erzielt, die von denen früherer Untersucher abweichen. Das DHE 45 ließ am intakten Hund in einer Dosierung von 0,01—0,05 mg/kg *niemals* einen Blutdruckabfall erkennen (s. Abb. 5). Die Kreislaufreaktion zeigte dieselben Kriterien wie sie nach Ergotamin beobachtet wurden. (Blutdruckerhöhung, Amplitudenabnahme, Frequenzabnahme, Erhöhung der Pulswellengeschwindigkeit, Zunahme des peripheren Widerstandes und Abnahme des Minutenvolumens.) Die Beeinflussung der Adrenalinwirkung war von derselben Art wie sie beim Ergotamin beschrieben wurde; auch nach DHE 45 nahm in der angegebenen Dosierung bei 3 Versuchen im Durchschnitt der Blutdruck um 10% *zu* (siehe Tabelle 1 und Abb. 6 und 7).

Um die Diskrepanz zwischen unseren Versuchsergebnissen und denen anderer Forscher zu klären, haben wir die Versuche an den gleichen

Tieren in *Narkose* wiederholt. Entsprechende Versuche in Eunarconnarkose erbrachten für beide Alkaloide ebenfalls nur eine Verstärkung der Adrenalinwirkung (s. Tabelle 1).

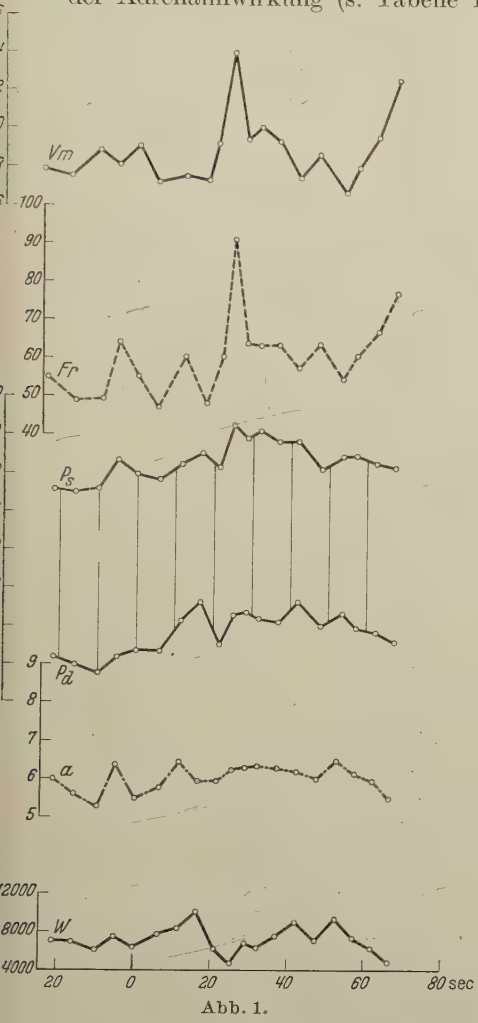


Abb. 1.

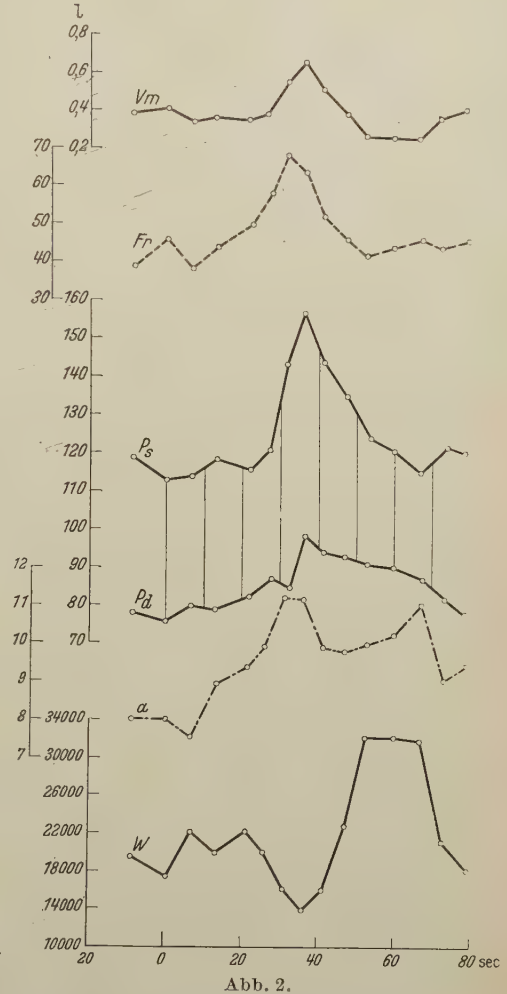


Abb. 2.

Abb. 1. Versuch 12 (Hund Bär). Kreislaufreaktion von 1,25 γ/kg Adrenalin (intravenös). Die Injektion erfolgte bei 0 sec. *Vm* Minutenvolumen in Liter; *Fr* Herzfrequenz; *Ps* systolischer Blutdruck in mm Hg; *Pd* diastolischer Blutdruck in mm Hg; *a* Pulswellengeschwindigkeit im Aorta-Iliakarohr in m/sec; *W* peripherer Widerstand in Dyn/cm³.

Abb. 2. Versuch 12. Gleiche Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Doch hatte der Hund 3 min vor der Adrenalininjektion 0,0125 mg/kg Gynergen intravenös erhalten.

Sämtliche Versuche an nicht narkotisierten und narkotisierten Hunden ließen demnach eine deutliche Steigerung der Adrenalinwirkung durch die Sekalealkaloide erkennen. Während die Ergotamindosierung

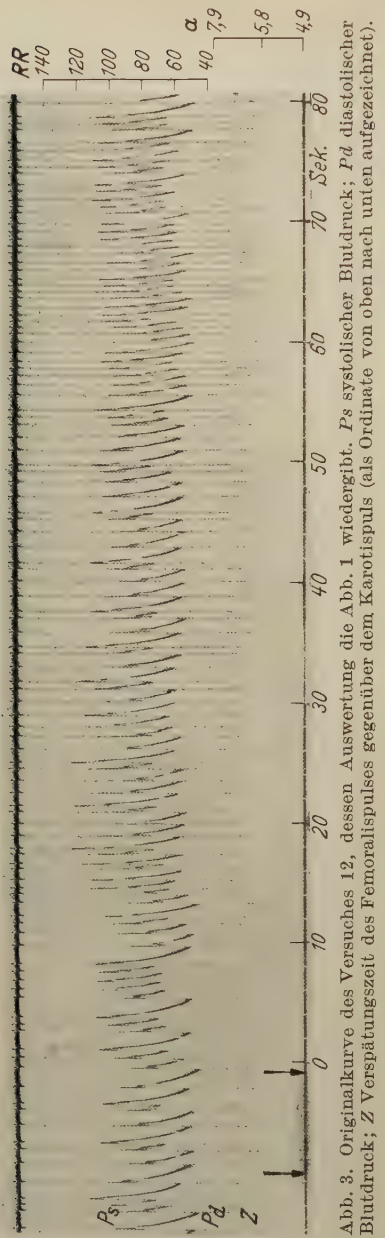


Abb. 3. Originalkurve des Versuches 12, dessen Auswertung die Abb. 1 wiedergibt. *Ps* systolischer Blutdruck; *Pd* diastolischer Blutdruck; *Z* Verspätungszeit des Femoralispulses gegenüber dem Karotispuls (als Ordinate von oben nach unten aufgezeichnet).

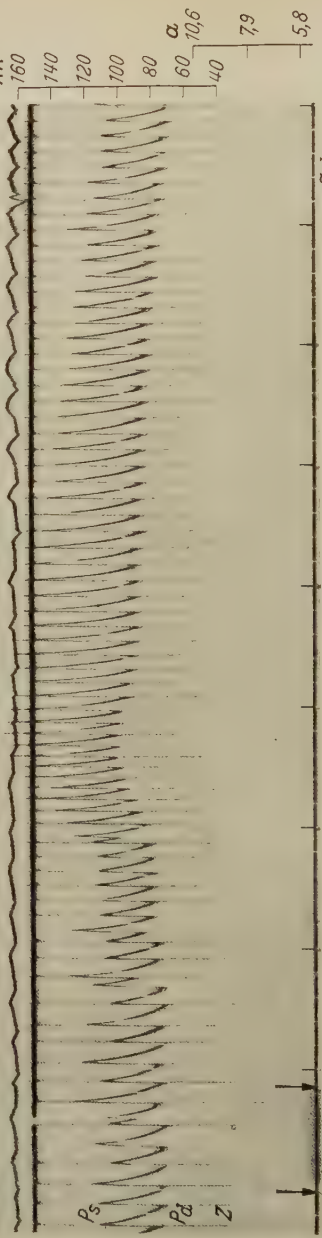


Abb. 4. Originalkurve des Versuches 12, dessen Auswertung die Abb. 2 wiedergibt. Zeichenerklärung s. Abb. 3.

in den eigenen Versuchen etwa $^1/_{10}$ der Dosis betrug, die nach Rothlin „sozusagen regelmäßig“ bei Hund und Katze eine Adrenalinumkehr hervorrufen soll, wurde das DHE 45 in der gleichen Dosierung

angewandt, die bei der narkotisierten Katze den Effekt einer fördernden Adrenalinwirkung aufheben soll (Rothlin). Obwohl der Hund gegenüber Sekalealkaloiden empfindlicher ist als die Katze (Barger), konnte auch beim DHE 45 keine

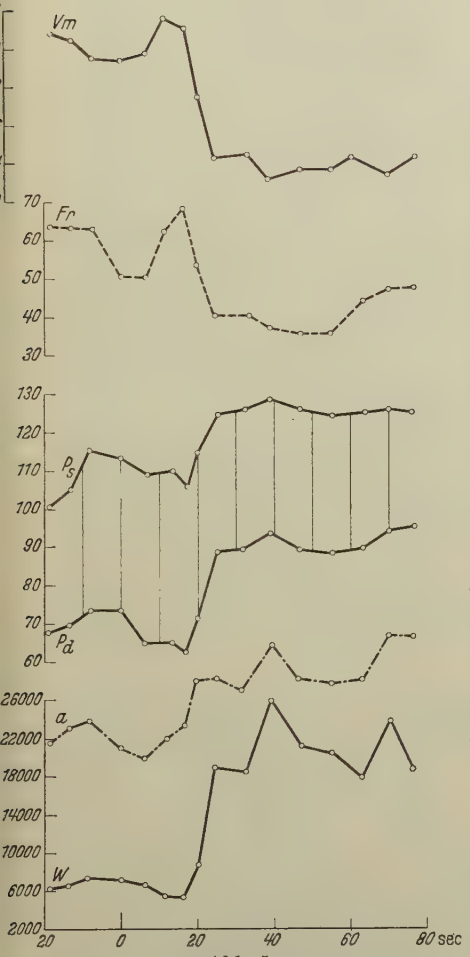


Abb. 5.

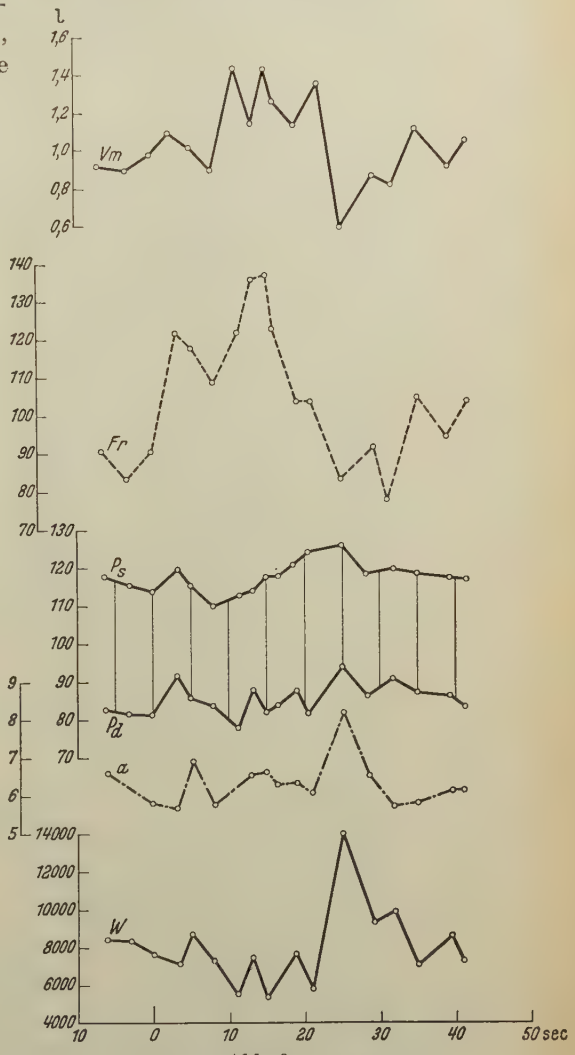


Abb. 6.

Abb. 5. Versuch 25 (Hund Nelly). Kreislaufreaktion nach der Injektion (intravenös) von 0,05 mg/kg Dihydroergotamin. Zeichenerklärung s. Abb. 1.

Abb. 6. Versuch 26 (Hund Bär). Kreislaufreaktion von 1,25 γ/kg Adrenalin. Zeichenerklärung s. Abb. 1.

Abschwächung der Adrenalinwirkung beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Alkaloiddosis schien aber unzweckmäßig, da bei der

angewandten Dosis die Hunde bereits heftig erbrechen und somit eine toxische Dosis bereits erreicht war.

Die Ursache der in sämtlichen Versuchen beobachteten verstärkten Adrenalinwirkung dürfte zunächst in dem nach der Sekalezufuhr vor-

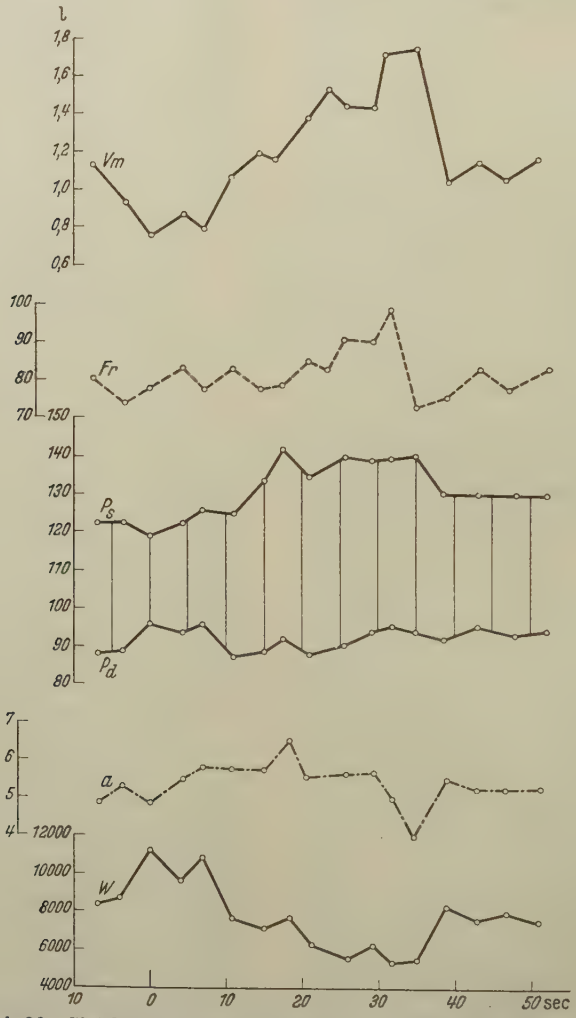


Abb. 7. Versuch 26. Gleiche Versuchsanordnung wie in Abb. 6. Doch hatte der Hund 12 min vorher 0,025 mg/kg Dihydroergotamin erhalten. Zeichenerklärung s. Abb. 1.

übergehend erhöhten Erregungszustand nicht nur des Vagus-, sondern auch des Vasomotorenzentrums zu suchen sein. Bei der Betrachtung der Druckpulse und des Frequenzganges nach der Verabreichung des Alkaloids fällt aber auf, daß noch ein zweiter wesentlicher Mechanismus beteiligt sein muß (Abb. 4). Das Pulsbild ist *monoton* geworden; ein

Puls gleicht dem anderen, die normale Arrhythmie ist beseitigt. In den ersten Minuten nach der Sekalezufuhr werden unter einer Adrenalininjektion sowohl die wellenförmigen Blutdruckschwankungen als auch die Vaguspulse ganz vermißt. Beide treten erst bei späteren Adrenalininjektionen wieder in Erscheinung. Die stärkere Blutdruckerhöhung dürfte daher auf einer Abschwächung der blutdrucksenkenden Gegenregulationen beruhen, die ihre Ursache nicht in einer Herabsetzung des zentralen Vagustonus, sondern in einer Hemmung der Reflexbahnen der Druckrezeptoren hat. Dieser Effekt wurde bereits 1923 von Rothlin für das Ergotamin nachgewiesen und sowohl durch Heymanns und Regnier[8] wie Wright[9] bestätigt (Dosierung 0,25 mg/kg bei Katze und Hund). Für das DHE 45 fanden kürzlich v. Euler und Messer[1]), daß man zwar die Entlastungsreflexe hiermit aufheben kann, daß aber die Vagodepressorenreflexe eine Verstärkung erfahren (Katze 0,15 mg/kg). Die eigenen Versuche lassen jedoch erkennen, daß am intakten Hund durch beide Alkaloide eine Hemmung der Reflexbahnen der Depressoren auftritt (Dosierung 0,01 mg/kg). Es werden aber nicht nur diese Vasomotorenreflexe abgeschwächt, sondern es tritt auch — im Gegensatz zu den Befunden von Wright,

Tabelle 1. *Maximale Blutdrucksteigerung im Verlauf der Adrenalinreaktion vor und nach der Zuführung eines Sekalealkaloides.*

Versuch	Hund	Alkaloid	Adrenalin	Maximale Blutdrucksteigerung								Zeitdifferenz zwischen Sekaleinjektion u. 2. Adrenalininjektion
				vor dem Sekalealkaloid				nach dem Sekalealkaloid				
				von	Pm	auf	Pm	%	von	Pm	auf	Pm	%	
6	Nelly	Gynergen 0,25 mg	20 γ	101/55	78	128/70	99	27	113/84	98	159/108	134	37	40 min
8	Nelly	Gynergen 0,25 mg	20 γ	106/69	87	119/81	100	14	120/93	107	137/96	119	11	2 min
12	Bär	Gynergen 0,25 mg	25 γ	101/54	77	110/64	91	18	113/76	95	157/98	128	35	2 min
23	Peter	Gynergen 0,25 mg + Eunarcomarkose	25 γ	105/85	95	121/94	108	7,8	124/105	115	209/145	177	53	2 min
10	Bär	DHE 45 0,25 mg	30 γ	100/54	77	110/55	83	8	85/46	66	105/53	79	20	12 min
25	Bär	DHE 45 0,5 mg	25 γ	113/81	98	121/88	104	5	134/95	114	162/102	130	14	2 min
27	Rolf	DHE 45 0,5 mg + Eunarcomarkose	30 γ	109/84	97	118/86	102	3,5	120/97	109	135/105	120	10	2 min

Pm = mittlerer Blutdruck.

Heymanns und Regnier — eine starke Hemmung der Herzreflexe ein, wie sie aus dem Verhalten der Pulsfrequenz (s. Abb. 7) während der Blutdruckänderungen gefolgert werden muß.

Zusammenfassung.

Am intakten Hund läßt sich durch Ergotamin oder durch Dihydroergotamin (0,012—0,05 mg/kg) keine Abschwächung oder Umkehr der blutdrucksteigernden Adrenalinwirkung erzielen. Das Dihydroergotamin allein führt in gleicher Weise wie das Ergotamin zu einer Steigerung des Blutdrucks mit Abnahme der Amplitude, Erhöhung der Pulswellengeschwindigkeit und Senkung der Herzfrequenz. Als Ursache dieser Reaktion wird die blockierende Wirkung der Sekalealkaloide auf die Kreislaufreflexe angesehen, die zu einer gegenüber der Blutdruckerhöhung abgeschwächten Gegenregulation führt.

Literatur.

[1] Stoll u. Hofmann: Helvet. chim. Acta **26**, 2070 (1943). — [2] Rothlin, E.: Klin. Wschr. **1925**, 1437. — Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1254. — [3] Sollmann and Brown: J. amer. med. Assoc. **45**, 229 (1905). — [4] Dale, H. H.: J. Physiol. (Brit.) **34**, 163 (1906). — [5] Bluntschli u. Götz: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 769. — [6] Schroeder, W.: Arch. Kreisl.forsch. **15**, 24 (1949). — [7] Steinmann, Ludi u. Barben: Helvet. med. Acta **15**, 76 (1948). — [8] Heymanns et Regnier: Arch. internat. Pharmacodynam. **36**, 116 (1929). — [9] Wright: J. Physiol. (Brit.) **69**, 331 (1930). — [10] Euler, v. u. Messer: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 20.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv, Bd. 207, S. 477—490 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Cholinesterase hemmender Wirkung.

Von

Fritz Heim und Diethard Amelung.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juni 1949.)

Unter den Untersuchungen über die unmittelbaren Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Cholinesterase hemmender Wirkung sind die Beobachtungen von Stedman und Stedman[1] von Bedeutung, daß für die Cholinesterase hemmende Wirkung des Physostigmins die Urethangruppe verantwortlich zu machen sei, während Bloch[2] fand, daß Phenol-Basen, die keine Urethangruppe enthalten, dem Physostigmin ähnliche Wirkungen besitzen. Nach Massart und Dufait[3] ist die Hemmungswirkung an das Vorhandensein einer dissoziierenden substituierten Ammoniumgruppe gebunden. Quartäre Ammoniumbasen gehören tatsächlich zu den stärksten Cholinesterasehemmern. Diese Beobachtungen entsprechen der Feststellung von Hanske[4], daß eine N-alkylierte Gruppe zum Zustandekommen der Ferment-Substratbindung notwendig ist.

Um weiteren Einblick in die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Cholinesterase hemmender Wirkung zu gewinnen, haben wir eine größere Anzahl bezüglich ihres chemischen Aufbaus in mehrerer Hinsicht sich nahestehender Körper untersucht. Es handelt sich um das Physostigmin und seine Spaltprodukte, um 4 Lokalanästhetika, und zwar das Pantocain, Kokain, Tutocain, Novocain und deren Spaltprodukte und um einige andere diesen Körpern verwandte Ester.

Die starke Cholinesterase hemmende Wirkung des Physostigmins ist bekannt. Ammon und Zipf[5] haben den Nachweis erbracht, daß auch die Lokalanästhetika Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain die Cholinesterase des Serums hemmen. Diese Befunde bedürfen insofern heute einer Ergänzung, als der sog. „unspezifischen Cholinesterase" des Serums eine erheblich geringere physiologische Bedeutung zukommen soll, als der „spezifischen" Cholinesterase. Nach den Beobachtungen von Alles und Hawes[6], Zeller[7], Augustinsson[8], Nachmansohn und Rothenberg[9] u. a. kommt diese vor allem in den Erythrozyten und im Gehirn vor. Sie unterscheidet sich von dem Acetylcholin hydrolysierenden Ferment des Serums in folgenden Eigenschaften:

Sie wird durch Substratüberschuß und Koffein spezifisch gehemmt und vermag im Gegensatz zur Serumcholinesterase auch Acetyl-β-methylcholin zu hydrolysieren. Diese spezifische Cholinesterase, auch als „e-Typ" bezeichnet, findet sich außer in den Erythrozytenmembranen und im Zentralnervensystem auch in anderen Organen z. T. gleichzeitig neben der unspezifischen Cholinesterase.

Methodik. Die Cholinesteraseaktivität wurde nach der von Ammon[10] angegebenen Methode bestimmt, indem die bei der fermentativen Hydrolyse des Acetylcholins durch Freiwerden der Essigsäure aus der Natriumbikarbonat-haltigen Ringerlösung ausgetriebene Kohlensäure manometrisch gemessen wurde. Zu den Versuchen verwendet wurde von nüchternen Personen frisch gewonnenes Serum. Die Erythrozytenhämolysate haben wir in der Weise hergestellt, daß die Erythrozyten nach Abzentrifugieren des Serums mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und schließlich durch Zugabe von destilliertem Wasser in einer dem abzentrifugierten Serum entsprechenden Menge hämolysiert wurden. Die Bereitung der Extrakte geschah in der Weise, daß die einer Ratte entnommenen Organe in Ringerlösung abgewaschen, mit der Schere zerkleinert, mit Quarzsand zerrieben und mit Krebs-Ringerlösung[11] extrahiert wurden. Nach Abzentrifugieren der korpuskulären Bestandteile konnte der überstehende Extrakt abpipettiert werden. Serum, Erythrozytenhämolysat und Organextrakte wurden im Eisschrank aufbewahrt und innerhalb 48 Std verwendet. Die im Einzelversuch zur Anwendung gekommenen Serum-, Erythrozyten- und Organextraktmengen, letztere umgerechnet auf die Organgewichte, betrugen: Serum 0,25 cm^3, Erythrozyten 0,2 cm^3, Gehirn 0,1 g, Darm 0,125 g, Leber 0,4—0,6 g, Muskulatur 0,6—0,8 g. Es wurden diese unterschiedlichen Organmengen deshalb gewählt, weil ihre Acetylcholin spaltende Wirksamkeit etwa einander entspricht. Es sei jedoch erwähnt, daß die Leber- und Muskelextrakte stets die geringste Aktivität aufwiesen. Die Gesamtflüssigkeitsmenge des Einzelversuchs betrug 6,0 cm^3. Das Hauptstück der Tröge enthielt 5,0 cm^3. Der Inhalt setzte sich zusammen aus dem fermenthaltigen Serum, Erythrozytenhämolysat oder Organextrakt, der zu untersuchenden Substanz und Krebs-Ringer-Lösung ad 5,0 cm^3. Im Ansatzstück befanden sich 0,03 m Mol Acetylcholinhydrochlorid gelöst in 1,0 cm^3 Krebs-Ringer-Lösung. Die fermentative Acetylcholinhydrolyse, die bei 35° C gemessen wurde, zeigte infolge des Substratüberschusses innerhalb der ersten halben Stunde einen fast linearen Verlauf, so daß wir der Berechnung der prozentualen Hemmungswirkung der von uns untersuchten Körper die 30-Minutenwerte zugrunde gelegt haben. Die in den Tabellen und Abbildungen aufgeführten Zahlen stellen jedesmal Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelbeobachtungen dar. Von diesen Zahlen wurden die CO_2-Werte der Kontroll-

versuche (Organextrakte ohne Acetylcholinzusatz, Organextrakte + zu untersuchende Substanz ohne Acetylcholinzusatz) und die für die Eigenhydrolyse des Acetylcholins gefundenen CO_2-Werte bereits in Abzug gebracht. Die Fermentaktivität wird durch die in der Zeiteinheit gebildeten mm^3 CO_2 wiedergegeben.

Wir haben als erstes festzustellen versucht, ob die oben genannten Körper neben der unspezifischen Serumesterase auch die spezifische Cholinesterase in Erythrozyten und Gehirn und die Acetylcholin spaltenden Fermentsysteme verschiedener Warmblüterorgane, die, wie bereits erwähnt, Gemische beider Fermenttypen enthalten sollen, zu hemmen imstande sind. Wir untersuchten: 1. Menschliches Serum, 2. menschliche Erythrozyten und 3. Extrakte aus Darm, Muskulatur,

Tabelle 1.

Millimol	Cholinesterasehemmung in Prozent nach 30 min						Dos. let. minim. mg/kg	Lipoidlöslichkeit
	0,2 cm^3 Serum	0,125 g Darm	0,6 g Muskulatur	0,4 g Leber	0,2 cm^3 Erythrozyten	0,1 g Gehirn		
0,0001 Physostigmin	100	96	100	93	100	95	4	leicht
0,01 Pantocain . .	100	92	77	73	88	62	8	6,2
0,01 Kokain . . .	96	88	75	72	42	54	15	3,5
0,01 Tutocain . .	98	61	38	42	25	10	20	1,6
0,01 Novocain . .	97	37	30	30	26	16	55—100	1,0

Leber und Gehirn der Ratte. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die in Spalte 2—7 der Tabelle aufgeführten Zahlen geben die prozentuale Hemmung der Acetylcholinhydrolyse 30 min nach Versuchsbeginn, d. h. nach Zusammengabe von Ferment und Substrat, wieder. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, hemmen 0,0001 m Mol Physostigmin die fermentative Spaltung von Acetylcholin durch Serum, Erythrozyten, Leber-, Darm-, Muskel- und Gehirnextrakte fast vollständig. Durch Pantocain, Kokain, Tutocain und Novocain in einer Menge von 0,01 m Mol wird nur die unspezifische Serumesterase fast vollkommen inaktiviert. Auf die Azetylcholin spaltenden Fermentsysteme des Darms, der Muskulatur, der Leber, des Gehirns und der roten Blutkörperchen wirken die Lokalanästhetika schwächer, und zwar nimmt ihre Hemmungswirkung in folgender Reihenfolge ab: Darm — quergestreifte Muskulatur — Leber — Erythrozyten — Gehirn. Während also die unspezifische Serumesterase durch die genannten Lokalanästhetika in der oben angegebenen Menge fast vollkommen gehemmt wird, ist der Einfluß auf die Organe, die die spezifische Cholinesterase enthalten, nämlich rote Blutkörperchen und Gehirn, am schwächsten. Da Darm, Muskulatur und Leber dazwischen stehen, ist anzunehmen, daß in diesen Organen, wie auch von anderer

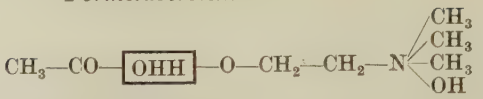
Seite behauptet wird, die spezifische Cholinesterase und eine unspezifische Esterase nebeneinander vorkommen, wobei im Darm die unspezifische, in der Leber die spezifische Cholinesterase zu überwiegen scheinen. Eine Abnahme der Hemmungswirkung der zugesetzten Lokalanästhetika infolge ihrer teilweisen eigenen Zerstörung durch Leber, Muskulatur oder Darm scheint unwahrscheinlich, da die prozentuale Hemmung sich während der gesamten Versuchsdauer von 1 Std nur um wenige Prozente verringert. Vergleicht man die 4 untersuchten Lokalanästhetika hinsichtlich ihrer Cholinesterase hemmenden Wirkung untereinander, so nimmt diese in der Reihenfolge Pantocain — Kokain — Tutocain — Novocain erheblich ab, und zwar hat diese Reihenfolge für alle von uns untersuchten Organsysteme Gültigkeit. So finden wir z. B. für das Novocain, daß die Serumesterase durch diesen Ester zu 97% gehemmt wird, die des Darms zu 37%, der Muskulatur und Leber zu 30%, die spezifische Cholinesterase in den Erythrozyten zu 26% und die des Gehirns noch zu 16%. Die Gründe für diese Differenzen im Wirkungsgrad sind vor allem in den Unterschieden im chemischen Aufbau dieser Ester und einer daraus resultierenden verschiedenen Affinität zu den beiden Cholinesterasesystemen zu suchen. Übrigens geht die Stärke der fermenthemmenden Wirkung der von uns untersuchten Ester weitgehend parallel dem Grad ihrer Giftigkeit für den Warmblüterorganismus. So beträgt, wie aus Tabelle 1 (Spalte 8) hervorgeht, die Dosis letalis am Kaninchen bei intravenöser Verabreichung für das Physostigmin 4 mg, für Pantocain 8 mg, Kokain 15 mg, Tutocain 20 mg und Novocain 55—100 mg pro Körpergewicht. Diese Daten haben wir den Arbeiten von Kunkel[12], W. R. Mecker und Frazer[13], O. Schaumann[14], W. Schulemann[15] und W. Laubender und W. Ost[16] entnommen. Eine weitere Parallele besteht zwischen der Cholinesterasehemmungswirkung und Giftigkeit einerseits und der Lipoidlöslichkeit der untersuchten Ester andererseits, wie wir den Angaben in Spalte 9 der Tabelle 1 entnehmen können. So haben wir zwar für das Physostigmin keine zahlenmäßigen Größen gefunden, für die Lokalanästhetika aber wurden von Rohmann und Scheurle[17] entsprechende Angaben gemacht. Die Werte der Lipoidlöslichkeit von Novocain, Tutocain, Kokain und Pantocain verhalten sich zueinander wie 1:1,6:3,5:6,2. Novocain, das die spezifische Cholinesterase am wenigsten hemmt, am schwächsten anästhesierend wirkt und für den Warmblüterorganismus die geringste Giftigkeit aufweist, besitzt unter den 4 Estern die geringste Lipoidlöslichkeit, während das Pantocain, das die Cholinesterase am stärksten hemmt und unter den 4 Lokalanästhetika am giftigsten ist, auch die höchste Lipoidlöslichkeit zeigt. Es scheinen also die Unterschiede im chemischen Aufbau Änderungen in der Lipoidlöslichkeit zu bedingen, die jedenfalls zum Teil für die quantitativen

Unterschiede der pharmakologischen Wirkungen dieser Körper verantwortlich zu machen sind.

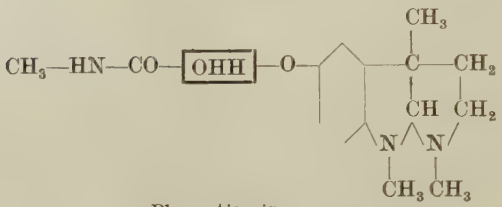
Wenn man Physostigmin, Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain hinsichtlich ihres chemischen Aufbaues untereinander und schließlich mit dem eigentlichen physiologischen Substrat der Cholinesterase, dem Acetylcholin vergleicht (s. Formeltabelle), so sind ihnen allen zwei Eigenschaften gemeinsam. Sämtliche Körper sind Ester, das Acetylcholin der des Cholins und der Essigsäure, das Physostigmin der Ester des Eserolins mit der Methylkarbaminsäure, das Kokain ein Ester des Methyl-Ekgonin mit der Benzoesäure und die Lokalanästhetika Pantocain, Tutocain und Novocain sind Esterverbindungen alkylierter Aminoalkohole mit der Paraaminobenzoesäure bzw. Substituenten derselben. Physostigmin und die Lokalanästhetika haben in konstitutionschemischer Hinsicht mit dem Acetylcholin noch eine zweite Gemeinsamkeit, die darin besteht, daß alle Körper im Molekül eine alkylierte Stickstoffgruppe besitzen, die ihnen den basischen Charakter verleiht. Acetylcholin ist ein chemisch und fermentativ sehr leicht hydrolysierbarer Ester. Das Physostigmin und die Lokalanästhetika dagegen erweisen sich sowohl chemisch, als auch fermentativ als weniger leicht aufspaltbar. Wenn wir annehmen, daß Acetylcholin bei der Substrat-Fermentreaktion sich mit eben der Stelle seines Moleküls an die prosthetische Gruppe des Fermentes bindet, an der es durch das Enzym hydrolytisch aufgespalten wird, dann ließe sich vermuten, daß Physostigmin und die Lokalanästhetika in ihrer Eigenschaft als Ester ebenfalls mit der prosthetischen Gruppe des Ferments eine Additions-Verbindung eingehen, die jedoch wesentlich dauerhafter sein wird als die des schnell zerfallenden Acetylcholins. Die Hemmungswirkung des Physostigmins und der Lokalanästhetika würde also als eine Blockierung der prosthetischen Gruppen der Cholinesterase aufzufassen sein.

Wenn das Vorhandensein einer Esterbindung im Molekül dieser Körper eine notwendige Voraussetzung für ihr Wirksamwerden als Fermentinhibitoren darstellt, dann dürfte von den Esterspaltprodukten des Physostigmins und der Lokalanästhetika eine esterasehemmende Wirkung nicht mehr zu erwarten sein. Die bei der chemischen Hydrolyse des Physostigmins, des Kokains, des Pantocains, Tutocains und Novocains entstehenden Spaltprodukte besitzen, wie wir im folgenden zeigen werden, tatsächlich eine nur geringe oder keine Cholinesterase hemmende Wirkung mehr. Die Versuchsergebnisse im einzelnen sind in Tabelle 2 zusammengestellt worden. Die Verseifung des Physostigmins haben wir selbst vorgenommen, die Spaltprodukte der übrigen Ester wurden uns zum großen Teil von den „Farbwerken Höchst“ in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Physostigminum salicylicum wurde mit rauchender Salzsäure hydrolysiert und das entstandene

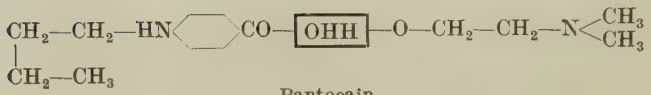
Formelübersicht.



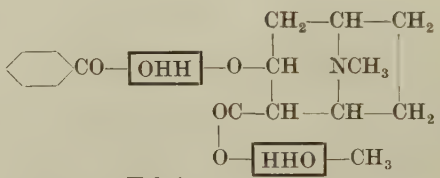
Acetylcholin



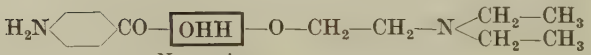
Physostigmin



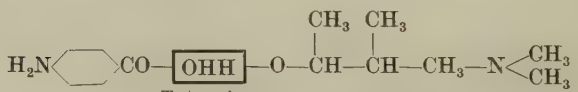
Pantocain



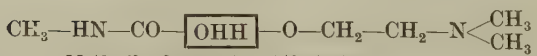
Kokain



Novocain

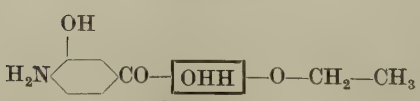


Tutocain

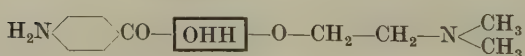


Methylkarbaminsäureäthylester

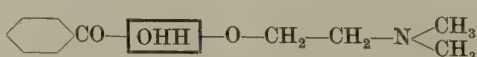
Anästhesin



Orthoform



P-Aminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols



Benzoesäureester des Dimethylaminoäthanols

Tabelle 2.

Die Zahlen bedeuten: mm³ CO_2 30 bzw 60 min nach Versuchsbeginn. Leerversuch = 5,0 cm³ fermenthaltige KREBS-RINGER-Lösung + 0,03 m Mol Acetylcholinhydrochlorid in 1,0 cm³ KREBS-RINGER-Lösung. A_{30} prozentuale Änderung der Fermentaktivität nach 30 min. — Hemmung, + Aktivierung.

	0,2 g Serum		A_{30}	0,125 g Darm		A_{30}	0,6 g Muskulatur		A_{30}	0,4 g Leber		A_{30}	0,2 g Erythrozyten		A_{30}	0,1 g Gehirn		A_{30}
Zeit in min	30	60		30	60		30	60		30	60		30	60		30	60	
Leerversuch	157	302		180	313		91	195		152	279		58	168		308	433	
0,0001 m Mol Physostigmin . . .	0	1	−100	8	22	−96	0	2	−100	11	30	−93	0	9	−100	16	31	−95
0,0001 m Mol Eserolin	173	332	+10	185	325	+3	72	156	−20	139	260	−8	60	177	+2	315	513	+2
Leerversuch	296	429		228	351		84	164		112	210		263	402		271	401	
0,01 m Mol Pantocain	0	0	−100	20	34	−92	20	50	−77	30	66	−73	33	75	−88	105	202	−62
0,01 m Mol Butyl-aminobenzoesäure .	296	453	±0	235	371	+3	94	178	+12	121	225	+8	256	399	−3	256	427	−5
0,01 m Mol Dimethyl-aminoäthanol . . .	297	461	±0	220	363	−3	75	150	−10	100	194	−10	206	365	−22	202	379	−25
Leerversuch	233	359		269	371		104	200		70	137		213	363		274	400	
0,01 m Mol Kokain .	10	32	−96	48	93	−88	26	62	−75	20	45	−72	125	239	−42	127	247	−54
0,01 m Mol Benzoesäure	252	394	+8	303	425	+15	97	193	−6	72	148	+3	224	398	+5	272	431	±0
0,01 m Mol Ekgonin .	256	406	+10	288	407	+7	95	190	−8	67	138	−4	220	338	+3	274	433	±0
Leerversuch	264	417		208	289		66	144		182	300		264	392		297	369	
0,01 m Mol Tutocain .	5	18	−98	81	59	−61	41	90	−38	103	190	−42	199	355	−25	268	382	−10
0,01 m Mol Para-aminobenzoesäure .	310	446	+6	206	275	−1	65	134	−1	182	301	±0	259	429	−2	301	432	+1
0,01 m Mol Dimethyl-amino-β-methyl-butanol	200	344	−24	169	299	−18	59	129	−10	152	264	−16	238	396	−10	285	421	−4
Leerversuch	223	357		194	323		80	159		186	301		205	365		301	423	
0,01 m Mol Novocain	7	28	−97	123	220	−37	55	115	−30	130	236	−30	152	291	−26	255	415	−16

Tabelle 2. (Fortsetzung).

	0,2 g Serum	Δ_{30}	0,125 g Darm	Δ_{30}	0,6 g Muskulatur	Δ_{30}	0,4 g Leber	Δ_{30}	2,2 g Erythrozyten	Δ_{30}	0,1 g Gehirn	Δ_{30}
0,01 m Mol Paraaminobenzoesäure	234	+5	184	−5	83	+3	171	−8	221	+8	314	+4
0,01 m Mol Diäthylaminoäthanol	396	+3	329		163		285		393		455	
	229	+3	185	−5	69	−14	176	−5	167	−19	262	−13
	387		321		146		273		324		434	
Leerversuch	207		229		71		210		313		307	
	326		358		148		318		373		410	
0,01 m Mol Anästhesien	202	−2	235	+2	70	−1	212	+1	324	+3	321	+4
	338		375		145		337		403		454	
0,01 m Mol Orthoform	217	+5	233	+2	63	−10	221	+5	309	−1	305	−1
	373		368		137		354		394		451	
0,01 m Mol Methylkarbaminsäureäthylester	243	+18	243	+6	66	−7	212	+1	325	+3	323	+5
	403		390		138		340		413		468	

Eserolin durch Mikrosublimation gereinigt. Der von uns mittels der Mikroschmelzpunktmethode gefundene Schmelzpunkt lag bei 125 bis 126°C, damit um 1—2° unterhalb des von Polonowsky[18] angegebenen Wertes. Da der Säureanteil des Physostigmins, die Methylkarbaminsäure, in freiem Zustand nicht beständig ist, so konnten wir deren Cholinesterase hemmende Wirkung nicht unmittelbar untersuchen, doch wurde der Äthylester der Methylkarbaminsäure in dieser Hinsicht geprüft. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, werden durch das Eserolin in einer dem Physostigmin äquimolekularen Konzentration weder die unspezifische Serumesterase, noch auch die Acetylcholin spaltenden Fermente aus Darm, quergestreifter Muskulatur, Leber, Erythrozyten und Gehirn in nennenswertem Ausmaß gehemmt. Das gleiche gilt für die Esterspaltprodukte des Kokains, das Ekgonin und die Benzoesäure. Unter den Spaltprodukten des Pantocains, Tutocains und Novocains üben die Säuren keine, die Alkohole dagegen — im Vergleich zu den intakten Estern — aber nur geringe Hemmungswirkung aus. Die Hemmungswirkung des Diäthylaminoäthanols auf die spezifische Cholinesterase der Erythrozyten und des Gehirns kommt allerdings wegen der geringen Wirksamkeit des Novocains selbst auf diesen Cholinesterasetyp der des Esters fast gleich. Es wurden die Spaltprodukte des Physostigmins, Pantocains, Kokains, Tutocains und Novocains nicht nur einzeln, sondern auch gemeinsam in einer den Estern äquimolaren Konzentration hinsichtlich ihrer Cholinesterase hemmenden Wirkung untersucht und mit der der entsprechenden

Ester verglichen. Wie aus den in Abb. 1—4 wiedergegebenen Versuchsbeispielen hervorgeht, üben diese Gemische aus der Säure- und Basenkomponente keinerlei nennenswerte Hemmungswirkung auf die fermentative Acetylcholinhydrolyse aus. Die Gegenwart der Säurekomponente scheint die geringe Inhibitorwirkung der alkoholischen Komponenten des Pantocains, Tutocains und Novocains vollständig aufzuheben.

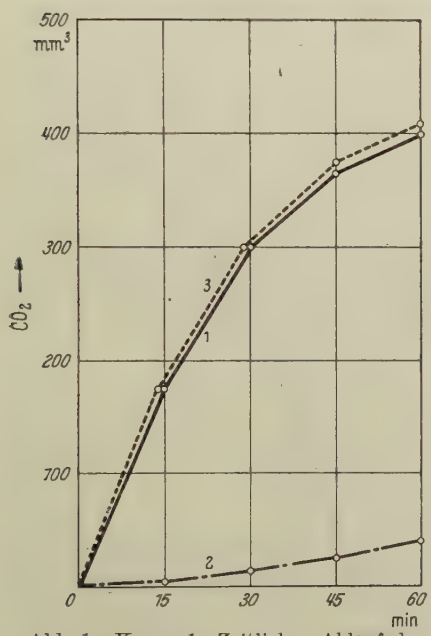


Abb. 1. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,25 cm³ menschliches Serum bei 35° C. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Novocain. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Diäthylaminoäthanol + 0,01 m Mol Paraaminobenzoesäure.

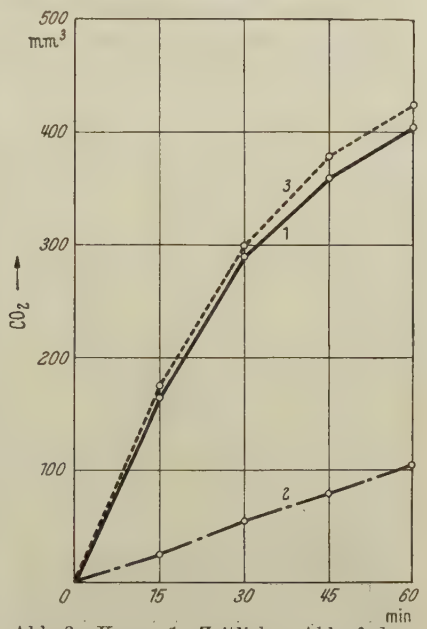


Abb. 2. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,125 g Rattendünndarm bei 35° C. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 Kokain. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Ekgonin + 0,01 m Mol Benzoesäure.

Auch der Methylkarbaminsäureester, die Verbindung der Säurekomponente des Physostigmins mit dem Äthylalkohol, hemmt keines der Cholinesterasesysteme der untersuchten Organe (Tabelle 2 und Abb. 4). Er übt im Gegenteil einen geringen aktivierenden Einfluß auf die Cholinesterasen aus. Da dieser Körper, den man auch als Methylurethan bezeichnen kann, ohne fermenthemmende Wirkung ist, obwohl er im Molekül eine Esterbindung und die Säurekomponente des Physostigmins besitzt, so ist die Cholinesterase hemmende Wirkung des Physostigmins wie auch Massart und Dufait[3] im Gegensatz zu Stedman und Stedman[1] annehmen, an das Vorhandensein der basischen zwei alkylierte Stickstoffatome enthaltenden Komponente geknüpft. Wir haben uns daraufhin die Frage vorgelegt, welche Bedeutung bei den

Lokalanästhetika der basischen alkoholischen Komponente des Moleküls zukommt. Vergleicht man Novokain und Anästhesin, das sich in chemischer Hinsicht durch das Fehlen der alkylierten Stickstoffgruppe vom Novocain unterscheidet (s. Formeltabelle), im Hinblick auf ihre Cholinesterase hemmende Wirkung miteinander, so stellen wir an Hand der in Tabelle 2 gemachten Zahlenangaben fest, daß das Anästhesin sich gegenüber den Cholinesterasesystemen aller von uns untersuchten Organe vollkommen

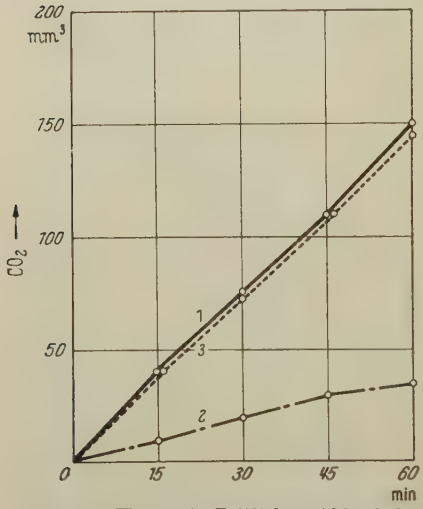


Abb. 3. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,6 g quergestreifte Rattenmuskulatur bei 35° C. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Pantocain. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Dimethylaminoäthanol + 0,01 m Mol Butylaminobenzoesäure.

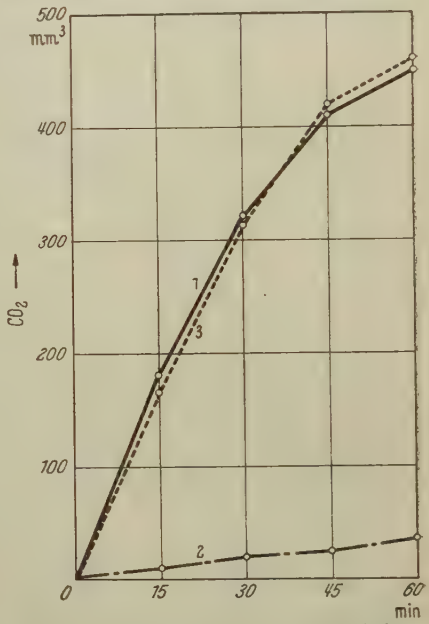


Abb. 4. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentaktiven Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,1 g Rattenhirn bei 35° C. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,0001 m Mol Physostigmin. salicylic. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,0001 m Mol Eserolin + 0,0001 m Mol Methylkarbaminsäureäthylester.

indifferent verhält. In Abb. 5 sind beispielsweise die Wirkungen von 0,01 m Mol Novocain und 0,01 m Mol Anästhesin auf den Ablauf der fermentativen Spaltung des Acetylcholins durch menschliches Serum einander gegenübergestellt. Ebenso wirkungslos wie Anästhesin ist das Orthoform, der Paraaminooxybenzoesäuremethylester. Mit dem Verlust der alkylierten Aminogruppe büßt also das Novocain seine Cholinesterase hemmende Wirkung ein. In Analogie zu dieser unterschiedlichen Wirkung von Novocain und Anästhesin möchten wir fast annehmen, daß auch Pantocain, Tutocain und selbst das Kokain nach Verlust der alkylierten Stickstoffgruppen im alkoholischen Anteil des Moleküls ebenfalls ihre Cholinesterase hemmende Wirkung einbüßen. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Feststellung von Hanske[4] hingewiesen, daß das Vorhandensein einer N-alkylierten Gruppe im

Molekül zum Zustandekommen der Bindung eines Substrats an das Fermentmolekül notwendig sei. Von gleichem Interesse ist die Beobachtung von AMMON[19], daß nämlich das Acetylcholamin ein Körper, der sich vom Azetylcholin nur durch das Fehlen der Alkylgruppen am Stickstoff des Moleküls unterscheidet, durch die Cholinesterase nicht gespalten wird. Das würde nach unserer Auffassung bedeuten, daß dem Acetylcholamin infolge Fehlens der Alkylgruppen die Fähigkeit der Bindung an das Fermentmolekül abgeht.

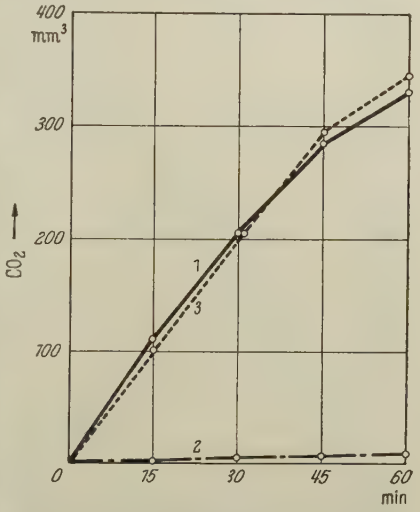


Abb. 5. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,25 cm³ menschliches Serum. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Novocain. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Anästhesin in 0,04 g Äthylalkohol gelöst.

Auf Grund der bisher mitgeteilten Beobachtungen lassen sich folgende Feststellungen treffen: Das Acetylcholin geht als Ester eines basischen Alkohols, in dessen Molekül eine alkylierte Stickstoffgruppe, und zwar eine quartäre Ammoniumgruppe verankert ist, sehr leicht eine Verbindung mit dem Ferment ein, die zur sofortigen Hydrolyse des Moleküls führt. Physostigmin und die von uns untersuchten Lokalanästhetika reagieren als Ester mit einer alkylierten Stickstoffgruppe, im Molekül ebenfalls mit dem Fermentmolekül, wobei es allerdings zu einer wesentlich dauerhafteren Verbindung mit der reaktionsfähigen Gruppe des Enzyms kommt, die zu deren Blockierung führt. Die Fähigkeit zur Bindung an das Enzym büßen sie ein bei Verlust der Esterbindung bzw. der alkylierten Stickstoffgruppe im Alkoholanteil des Moleküls.

Versucht man eine weitere Erklärung für die von uns beobachteten quantitativen Unterschiede in der fermenthemmenden Wirkung zwischen Physostigmin, Pantocain, Tutocain und Novocain, so wird man erhebliche Verschiedenheiten in der Affinität der einzelnen Körper zum Fermentsystem annehmen müssen, die in den Besonderheiten des chemischen Aufbaus der einzelnen Ester zu suchen sind. Vielleicht kommt hier schon der Art der Esterbindung selbst eine gewisse Bedeutung zu, denn bei dem stark wirksamen Physostigmin und Prostigmin liegt z. B. eine Esterbindung zwischen der Karboxylgruppe einer aliphatischen Säure und den phenolischen OH-Gruppen eines relativ großen basischen Moleküls vor. Die Lokalanästhetika dagegen sind Ester aromatischer Säuren mit Alkoholen. Die Bedeutung der Art der N-Alkylierung an der alkoholischen Komponente der genannten Ester erhellt aus einem Vergleich zwischen der Cholinesterase hemmenden Wirkung des Novo-

cains = Paraaminobenzoesäureester des Diäthylaminoäthanols und dem gleichen Säureester des Dimethylaminoäthanols. Beide Körper unterscheiden sich also nur in der Art der Alkylierung des Aminoalkohols. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht ist die Cholinesterasehemmungswirkung des methylalkylierten Esters, nur um wenige Prozent geringer als die des äthylalkylierten Esters, d. h. des Novocains. Dies ist insofern von Wichtigkeit, als sich das Pantocain von dem eben besprochenen Paraaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols nur noch im Bau der Aminogruppe der Säurekomponente unterscheidet, indem an dieser Stelle ein Butylrest substituiert ist. Zusammen mit diesen beiden Körpern konnten wir noch den Benzoesäureester des Dimethylaminoäthanols auf seine Cholinesterase hemmende Wirkung untersuchen. Die Konstitutionsformel der drei eben genannten Ester sind aus der Formeltabelle zu ersehen. Wie nun aus Tabelle 3 hervorgeht, hemmt das Pantocain die Serumesterase 100%ig, der Paraaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols zu 90%, während der einfache Benzoesäureester des gleichen Alkohols fast wirkungslos ist. Auch die spezifische Cholinesterase in Erythrozyten und Gehirn und die Leber-, Darm- und Muskelextrakte werden durch ihn in kaum nennenswerter Weise beeinflußt. Während durch den Paraaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols die unspezifische Serumesterase sehr stark gehemmt wird, ist seine Wirkung auf die spezifische Cholinesterase der Erythrozyten und des Gehirns und die Acetylcholin spaltenden Fermente von Leber, Darm und Muskulatur zwar stärker als die des einfachen Benzoesäureesters, aber wesentlich geringer als die des Pantocains. In Abb. 6 sind die Hemmungswirkungen des Butylaminobenzoesäureesters-, des Paraaminobenzoesäureesters- und des Benzoesäureesters- des Dimethylaminoäthanols auf die fermentative Hydrolyse des Acetylcholins durch Rattendünndarm graphisch dargestellt. Wir stellen an Hand dieser Abbildung und der Tabelle 3 fest, daß der NH_2-Gruppe in der Säurekomponente eine wirkungsverstärkende Bedeutung zukommt, die durch Alkylierung eine weitere und zwar erhebliche Verstärkung

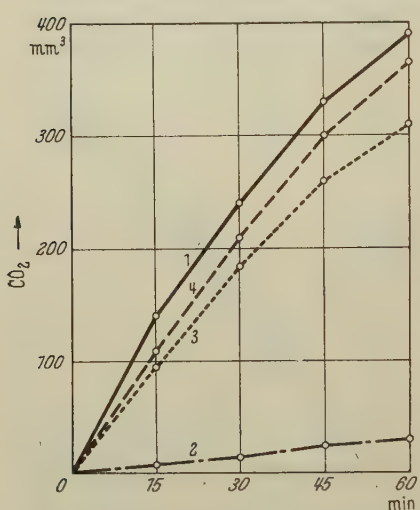


Abb. 6. Kurve 1: Zeitlicher Ablauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 m Mol Acetylcholin durch 0,125 g Rattendünndarm bei 35° C. Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Pantocain. Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Paraaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols. Kurve 4: Wie Kurve 1 + 0,01 m Mol Benzoesäureester des Dimethylaminoäthanols.

erfährt. Da diejenigen Ester, die in stärkerem Maße die Cholinesterase hemmen, wie z. B. das Physostigmin, Prostigmin, Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain in ihrer Säurekomponente eine freie oder alkylierte Aminogruppe besitzen und andererseits beim Fehlen dieser Aminogruppe, wie z. B. in dem von uns untersuchten Benzoesäureester des Dimethylaminoäthanols, auch die Cholinesterase hemmende Eigenschaft verloren geht, so ist anzunehmen, daß ein Ester ganz allgemein erst dann in höherem Maße Cholinesterase hemmende Eigenschaften bekommt, wenn zur Esterbindung und zur alkylierten Stickstoffgruppe des Alkoholanteils noch eine freie oder alkylierte Aminogruppe in der Säurekomponente hinzutritt. Dabei scheint, wie wir beim Vergleich des Paraaminobenzoesäureesters des Dimethylaminoäthanols mit dem Butylaminobenzoesäureester des gleichen Alkohols feststellen konnten, die Alkylierung die Hemmungswirkung erheblich zu steigern.

Zusammenfassung.

0,0001 m Mol Physostigmin in 6,0 cm³ Flüssigkeit bewirken eine totale

Tabelle 3. Die Zahlen bedeuten: mm³ CO_2 30 bzw. 60 min nach Versuchsbeginn. Leerversuch = 5,0 cm³ fermenthaltige Krebs-Ringer-Lösung + 0,03 m Mol Acetylcholinhydrochlorid in 1,0 cm³ Krebs-Ringer-Lösung. A_{30} prozentuale Änderung der Fermentaktivität nach 30 min. — Hemmung, + Aktivierung.

	0,2 g Serum		A_{30}	0,125 g Darm		A_{30}	0,6 g Muskulatur		A_{30}	0,4 g Leber		A_{30}	0,2 g Erythrozyten		A_{30}	0,1 g Gehirn		A_{30}
Zeit in min	30	60		30	60		30	60		30	60		30	60		30	60	
Leerversuch	214	346		234	385		21	65		81	161		256	361		200	334	
0,01 m Mol Butylaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols	0	0	−100	10	26	−96	3	17	−86	26	63	−68	31	74	−88	66	135	−67
0,01 m Mol Paraaminobenzoesäureester des Dimethylaminoäthanols	18	37	−91	179	307	−23	18	46	−14	60	127	−26	196	306	−24	171	298	−14
0,01 m Mol Benzoesäureester des Dimethylaminoäthanols . . .	194	338	−9	207	362	−11	19	48	−9	70	138	−13	227	385	−10	176	322	−12

Hemmung der fermentativen Hydrolyse von Acetylcholin durch menschliches Serum und Erythrozyten, Darm-, Muskel-, Leber- und Gehirnextrakte der Ratte.

Durch Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain in einem Zusatz von 0,01 m Mol zu 6,0 cm^3 Flüssigkeit wird die Serumesterase fast vollständig inaktiviert. Ihre Hemmungswirkungen auf die Acetylcholin spaltenden Fermente im Darm, Muskulatur, Leber, Erythrozyten und Gehirn sind geringer. Die Wirkung nimmt ab in der Reihenfolge, Pantocain — Kokain — Tutocain — Novocain.

Die Esterspaltprodukte des Physostigmin, Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain hemmen die Cholinesterase der untersuchten Organe wenig oder gar nicht.

Das gleiche gilt für den Methylkarbaminsäureäthylester, der die Säurekomponente des Physostigmins in Esterbindung mit dem Äthylalkohol enthält.

Ebenfalls ohne Hemmungswirkung sind Orthoform und Anästhesin, das sich vom Novocain nur durch das Fehlen der alkylierten Stickstoffgruppe des Alkohols unterscheidet. Die Cholinesterase hemmende Wirkung des Benzoesäureesters des Dimethylaminoäthanols wird etwas gesteigert durch Substituierung von H am Benzoesäurering in Parastellung durch NH_2 und nimmt erheblich zu nach Einführung eines Butylrests in die substituierte NH_2-Gruppe.

Aus alledem wird geschlossen, daß die Cholinesterase hemmende Wirkung der untersuchten Ester an das Vorhandensein einer Esterbindung und einer alkylierten Stickstoffgruppe am Alkoholanteil des Moleküls geknüpft ist. Auch in der Säurekomponente muß eine primäre oder alkylierte Stickstoffgruppe vorhanden sein.

Der Mechanismus der Hemmungswirkung wird in einer Blockierung der prostetischen Gruppen des Ferments gesehen.

Literatur.

[1] Stedman and Stedman: Biochem. J. (Brit.) **25**, 1147 (1931). — [2] Bloch, H.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 292 (1939). — [3] Massart u. Dufait: Natuurwet. Tschr. **22**, 243 (1940). — [4] Hanske, W.: Angew. Chem. **54**, 357 (1941). — [5] Ammon u. Zipf: Klin. Wschr. **1941**, 1176. — [6] Alles and Hawes: J. biol. Chem. (Am.) **133**, 375 (1940). — Science (N. Y.) **100**, 75 (1944). — [7] Zeller, E. A.: Helvet. physiol. pharmakol. Acta **2** C, 23 (1944). — [8] Augustinsson, K.-B.: Nature (Brit.) **156**, 303 (1945). — [9] Nachmansohn, D., and M. A. Rothenberg: J. biol. Chem. (Am.) **158**, 653 (1945). — [10] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [11] Krebs u. Henseleit: Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1933). — [12] Kunkel: Handbuch der Toxikologie. Jena 1901. — [13] Mecker, W. R., and E. B. Frazer: J. Pharmacol. (Am.) **22**, 375 (1923). — [14] Schaumann, O.: Arch. exper. Path. (D.) **190**, 47 (1938). — [15] Schulemann, W.: Klin. Wschr. **1924**, 676. — [16] Laubender, W., u. W. Ost: Arch. exper. Path. (D.) **165**, 520 (1932). — [17] Rohmann u. Scheurle: Arch. Pharmaz. **225**, 236 (1936); **274**, 110. — [18] Polonowsky: Chem. Zbl. **1915 II**, 1107; **1916 I**, 710. — [19] Ammon, R.: In Ammon u. Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine. Leipzig 1938.

Prof. Fritz Heim, Marburg a. d. Lahn, Pharmakolog. Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 491—499 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz).

Adrenalindiurese und Kochsalzausscheidung.

Von
Günther Kroneberg und Hans Ocklitz.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1948.)

Frühere Untersuchungen des Instituts[1] hatten ergeben, daß *Adrenalin* bei Meerschweinchen nach Wasserbelastung stark diuretisch wirkt: Das aufgenommene Wasser wurde beschleunigt ausgeschieden, die sezernierten *Harnmengen* waren weit größer als die verabfolgten Wassermengen. Die Beschleunigung der Ausscheidung wurde auf die *Kreislaufwirkung*, die „überschießende" Harnsekretion auf eine *Gewebswirkung* des Adrenalins zurückgeführt. In einer späteren Arbeit von Holtz und Credner[2] ließ sich zeigen, daß beide am Zustandekommen der diuretischen Wirkung beteiligten Komponenten — die Kreislauf — und die Gewebswirkung — durch *Ergotoxin* und *Yohimbin* in charakteristischer Weise beeinflußt werden: An die Stelle der beschleunigten Sekretion trat eine Sekretionssperre und von einer „überschießenden" Harnsekretion war nichts mehr zu bemerken. Es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß die „Gewebswirkung" des Adrenalins, der eine Mobilisierung von Gewebswasser zugrunde liegen mußte, durch eine Beeinflussung des *Mineralhaushaltes*, eine erhöhte Kochsalzausscheidung, ursächlich bedingt sei. Unsere eigenen Untersuchungen hatten das Ziel, diese Vermutungen zu stützen.

Über die Wirkung von Adrenalin auf die Kochsalzausscheidung liegen widersprechende Ergebnisse vor. Von den zahlreichen Untersuchungen seien hier nur einige aufgeführt. Biberfeld[3] fand an *Kaninchen* nach subkutaner Adrenalininjektion eine *verminderte* Kochsalzausscheidung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Frey, Bulke und Wels[4]. Zu direkt entgegengesetzten Resultaten kamen Stransky[5] an *Kaninchen* sowie Falta[6] in Versuchen an *Hunden*.

Versuche.

Die *Methodik* war die gleiche wie in den Versuchen von Holtz und Credner[1, 2]: Die Versuchstiere — männliche Meerschweinchen im Gewicht von 500—600 g — erhielten am Vorabend des Versuches 4 cm³ je 100 g destilliertes Wasser mit der Schlundsonde („Vorwässerung"), am nächsten Morgen zum eigentlichen Versuch 5 cm³ je 100 g Wasser („Hauptwässerung"), anschließend das zu prüfende Pharmakon in Form einer intramuskulären Injektion. Jedes Tier war vorher einem „*Leerversuch*" — Vor und Hauptwässerung — unterzogen worden. Die in diesen Leerversuchen erhaltenen Werte stimmen gut überein mit den von Holtz und Credner[1, 2] angegebenen (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Harnsekretion von Meerschweinchen in Prozent der verabfolgten Wassermenge (5 cm³/100 g). „Leerversuche".*

	60 min %	120 min %	180 min %	240 min %	480 min %	Durchschnittswert aus
Nach Holtz und Credner						
I. Tierreihe	30	73	91	98	112	30 Versuchen
II. Tierreihe	19	61	84	96	113	30 Versuchen
Nach eigenen Versuchen .	30	66	88	98	114	36 Versuchen

Die *Kochsalzbestimmungen* im Harn wurden nach der von Volhard angegebenen argentometrischen Methode in den nach 90, 150, 240 und 480 min ausgeschiedenen Harnmengen vorgenommen.

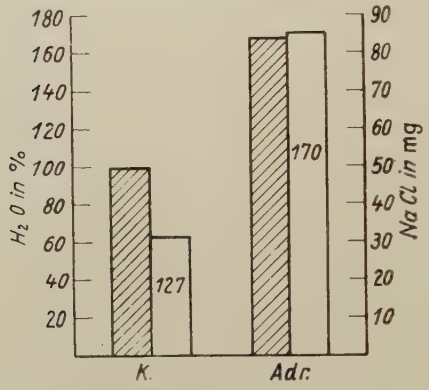


Abb. 1. Meerschweinchendiurese nach Adrenalin (4-Stunden-Werte). Wasserausscheidung in Prozent der verabfolgten Wassermenge ▨, Kochsalzausscheidung in mg ▭, Zahlen = mg-% NaCl. *K.* Kontrolle (Meerschweinchen Nr. 15, 520 g). *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin (Meerschweinchen Nr. 10, 600 g). Adrenalin erhöht die Wasserausscheidung um 70%, die NaCl-Ausscheidung um mehr als 100%. Deshalb ist die NaCl-Konzentration des Harns nach Adrenalin erhöht.

Adrenalin.

In dem in der Abb. 1 dargestellten Versuchsbeispiel liegen die Werte für die *Wasserdiurese* nach *Adrenalin* 70% höher als im Kontrollversuch, die Werte für die *Kochsalzausscheidung* mehr als 100%. Unter der Adrenalinwirkung ist es nicht nur zur Ausscheidung größerer Harnmengen, sondern auch zur Ausscheidung eines *konzentrierteren* Harns gekommen: Die NaCl-Konzentration des *„Adrenalinharns"* beträgt 170 mg-%, die des *Kontrollharns* hingegen nur 127 mg-%. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über 7 andere gleichsinnig verlaufene Versuche. Bei den Kontrollen liegt die Kochsalzkonzentration im Durchschnitt bei 115 mg-%, bei den Adrenalintieren trotz der weit größeren Harnmengen bei 198 mg-%.

Adrenalin-Yohimbin.

In den Versuchen von Holtz und Credner[2] wurde die erhöhte Wasserdiurese nach Adrenalin durch *Yohimbin* aufgehoben. Zu Beginn des Versuchs kam es sogar zu einer 1—1½ Stunden dauernden *Diuresesperre*, die offenbar ihre Ursache in einer Umkehr der Kreislaufwirkung des Adrenalins hatte. Nach Lösung der Sperre holte dann die Diurese nicht auf bis zu den Werten der Adrenalinvergleichstiere, sondern erreichte nur die Werte der unbehandelten Kontrolltiere, ein Zeichen

Tabelle 2. *Die Beeinflussung der Wasserdiurese und Kochsalzausscheidung durch Adrenalin* (4-Stunden-Werte).

Meerschweinchen	Körpergewicht g	Harnmenge in Prozent des verabfolgten Wassers	NaCl mg	NaCl mg-%
		1. Kontrolltiere.		
12	580	100	35	120
14	570	108	36	117
9	630	107	36	107
10	580	91	31	117
15	520	97	32	127
8	560	97	33	122
29	650	107	34	98
Mittelwerte	584,3	101	33,8	115,4
		2. Adrenalintiere (500 γ/kg Adrenalin i.m.).		
13	550	170	98	209
38	570	159	100	220
991	610	160	89	182
12	600	175	102	196
10	600	168	85	170
20	590	165	93	194
14	580	168	108	220
Mittelwerte	585,7	166,4	96,4	198,7

Tabelle 3. *Die Beeinflussung der Wasser- und Kochsalzausscheidung nach Adrenalin durch gleichzeitige Yohimbingaben* (4-Stunden-Werte).

Meerschweinchen	Körpergewicht g	Harnmenge in Prozent des verabfolgten Wassers	NaCl mg	NaCl mg-%
		1. Yohimbin (4 mg/kg Yohimbin. hydrochl.)		
46	500	103	30	116
14	570	96	34	124
532	610	118	36	100
10	580	93	27	99
991	600	91	29	106
8	520	104	25	93
9	610	114	38	109
Mittelwerte	570	102	31,3	107
		2. Adrenalin-Yohimbin (500 γ/kg Adrenalin + 4 mg/kg Yohimbin).		
17	540	94	31	122
34	560	95	37	139
532	630	93	33	112
46	520	115	41	137
38	520	103	32	120
29	660	87	29	101
16	560	96	30	111
Mittelwerte	570	97,5	33,3	120,3

dafür, daß auch die „*Gewebswirkung*“ des Adrenalins — die Wassermobilisierung im Gewebe — durch Yohimbin aufgehoben wird.

Auf Grund unserer bisherigen Versuche darf wohl angenommen werden, daß diese „wassermobilisierende" Gewebswirkung des Adrenalins die Folge einer primär *salzmobilisierenden* Wirkung ist. Es war deshalb zu erwarten, daß der von Holtz und Credner beobachteten Hemmung der Adrenalindiurese durch *Yohimbin* eine verminderte Kochsalzmobilisation und -ausscheidung entsprechen und ursächlich zugrunde liegen würde. Die Tabelle 3 zeigt eine Reihe von Versuchen,

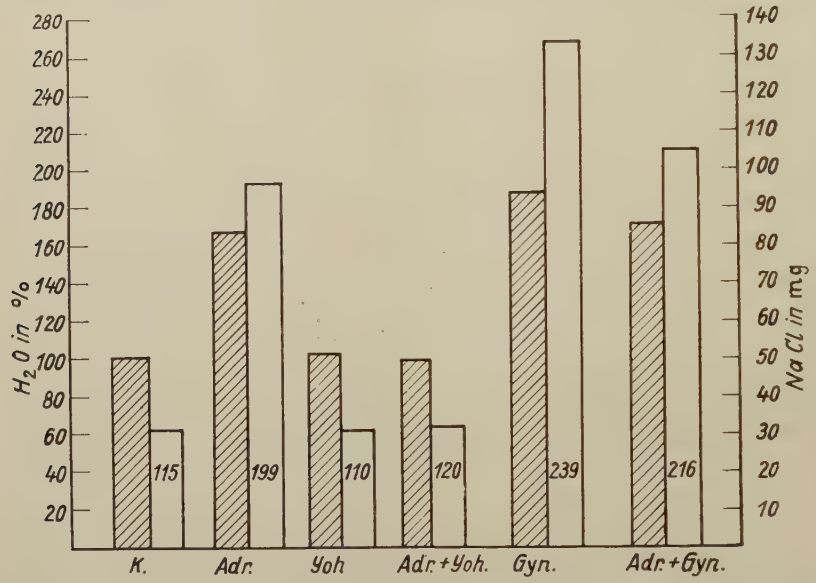


Abb. 2. Meerschweinchendiurese nach gleichzeitiger Injektion von Adrenalin + Yohimbin und Adrenalin + Ergotamin (Gynergen). (4-Stunden-Werte; Mittelwerte der in den Tabellen 2, 3 und 4 aufgeführten Versuche.) Wasserausscheidung in Prozent des verabfolgten Wassers ▨. Kochsalzausscheidung in mg ▭, Zahlen = mg-% NaCl. *K.* Kontrolle; *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin; *Yoh.* 4 mg/kg Yohimbin. hydrochlor.; *Adr.* + *Yoh.* 500 γ/kg Adrenalin + 4 mg/kg Yohimbin. hydrochlor.; *Gyn.* 125 γ/kg Gynergen; *Adr.* + *Gyn.* 500 γ/kg Adrenalin + 125 γ/kg Gynergen.

in denen wir nach gleichzeitiger Injektion von *Adrenalin* und *Yohimbin* neben der Wasserausscheidung auch die Kochsalzausscheidung verfolgten: Yohimbin hebt den Kochsalz- und wassermobilisierenden Effekt des Adrenalins vollkommen auf, so daß die Wasser- und Kochsalzwerte für die „Yohimbintiere" mit den entsprechenden Werten der Kontrolltiere praktisch übereinstimmen. Der graphischen Darstellung der Abb. 2 liegen die Durchschnittswerte der in Tabelle 3 aufgeführten Einzelversuche zugrunde.

Adrenalin-Ergotamin.

In den erwähnten Untersuchungen von Holtz und Credner hatte sich die diuretische Adrenalinwirkung durch *Ergotoxin* in prinzipiell

gleicher Weise wie durch *Yohimbin* beeinflussen lassen. Wie nach Yohimbin, so kam es auch nach Ergotoxin zu einer deutlichen Diuresesperre, die „überschießende" Harnsekretion der „Adrenalintiere" blieb aus.

Da uns Ergotoxin nicht mehr zur Verfügung stand, haben wir unsere Versuche mit *Ergotamintartrat* in Form des Handelspräparates „*Gynergen*" gemacht. Zu unserer Überraschung zeigte das *Ergotamin* im Gegensatz zum Verhalten von Ergotoxin in den früheren Untersuchungen eine ausgesprochene *Eigenwirkung*. Dosierungen von 125 γ — 1 mg/kg veranlaßten eine starke Diuresef*örderung*: Die Ausscheidungswerte für

Tabelle 4. *Die Beeinflussung der Wasserdiurese und Kochsalzausscheidung nach Adrenalin durch gleichzeitige Ergotamingaben* (Gynergen, 4-Stunden-Werte).

Meerschweinchen	Körpergewicht g	Harnmenge in Prozent der verabfolgten Wassermenge	NaCl mg	NaCl mg-%
		1. Gynergen (125 γ/kg Gynergen).		
45	690	188	145	223
532	650	189	133	217
13	520	219	158	277
991	630	193	151	232
16	580	179	121	240
26	480	154	90	244
Mittelwerte	591,7	187	133	238,8
		2. Adrenalin-Gynergen (500 γ/kg Adrenalin + 125 γ/kg Gynergen).		
36	650	161	109	209
29	650	168	120	220
30	480	157	94	250
15	470	179	71	170
12	620	183	132	232
Mittelwerte	574	169,6	105,2	216,2

Harn und Kochsalz liegen nach Ergotamin sogar höher als in den Versuchen mit Adrenalin (Abb. 2). Eine *antagonistische* Beeinflussung der Gewebs wirkungdes Adrenalins durch das *synergistisch* wirkende Ergotamin konnte deshalb nicht erwartet werden und trat auch nicht auf, wie aus den weiteren Versuchen der Tabelle 4 hervorgeht. Bei Anwendung niedrigerer Dosierungen würde sich vielleicht zeigen lassen, daß es bei der Kombination *Adrenalin-Ergotamin* zu einer Addition der Einzeleffekte kommt.

Daß dem Ergotamin andererseits — ähnlich wie dem Ergotoxin und Yohimbin — eine auch im Diureseversuch demonstrierbare „sympathicolytische" adrenalinantagonistische Wirkung zukommt, erkennt man an dem Verlauf eines in der Abb. 3 dargestellten Versuches, in

dem die komplette Diuresesperre von $1^1/_2$ Stunden Dauer, wie sie auch nach Ergotoxin und Yohimbin auftritt, charakteristisch ist.

Adrenalin-Pituglandol.

Den Befund von HOLTZ und CREDNER, daß die in einer mehrstündigen Diuresesperre zum Ausdruck kommende antidiuretische Wirkung der Hypophysenhinterlappenextrakte durch Adrenalin aufgehoben werden kann, haben wir bestätigt. Bei gleichzeitiger Injektion von *Adrenalin* und *Pituglandol* verläuft der Diureseversuch so, als wäre Adrenalin allein gegeben worden. Die Kochsalzkonzentration des sezernierten Harns ist lediglich höher als im Vergleichsversuch mit Adrenalin, da die bekannte NaCl-mobilisierende Wirkung des Pituglandols erhalten bleibt und sich zu der gleichgerichteten Adrenalinwirkung hinzuaddiert (Abb. 4).

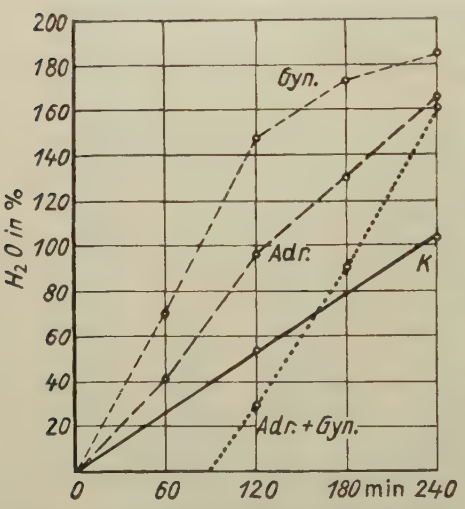


Abb. 3. Meerschweinchendiurese: Verlauf der Wasserausscheidung nach Adrenalin und Gynergen (Versuchsbeispiel). Wasserausscheidung in Prozent der verabfolgten Wassermenge. *K.* Kontrolle (Meerschweinchen Nr. 29, 650 g); *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin (Meerschweinchen Nr. 20, 590g); *Gyn.* Gynergen 125 γ/kg (Meerschweinchen Nr. 532, 650 g); *Adr.* + *Gyn.* 500 γ/kg Adrenalin + 125 γ/kg Gynergen (Meerschweinchen Nr. 36, 650 g).

Es ist bekannt, daß der antidiuretische Effekt des Hypophysenhormons ausbleibt, wenn man die „Wässerung" der Versuchstiere nicht mit reinem Wasser, sondern mit Kochsalzlösung vornimmt. Es liegt deshalb nahe, die Ursache für die Aufhebung der Antidiurese durch gleichzeitig verabfolgtes Adrenalin in dessen „Gewebswirkung", d. h. in der durch Adrenalin veranlaßten Mobilisierung von Kochsalz zu erblicken.

Besprechung der Ergebnisse.

Die *erhöhte Kochsalzausscheidung*, die sich in sämtlichen Versuchen nach Adrenalin zeigte, dürfte ihre Ursache in einer Mobilisierung von Kochsalz aus den Gewebsdepots haben. Das unter der Adrenalinwirkung in erhöhtem Maße ins Blut gelangende Kochsalz muß eliminiert werden. Das hierzu benötigte Lösungswasser veranlaßt dann die „überschießende" Harnsekretion der früheren und unserer Versuche. Dieser Zusammenhang zwischen vermehrter Wasserdiurese und erhöhter Kochsalzausscheidung zeigte sich auch bei der Kombination mit *Yohimbin*

und Hypophysenhinterlappenextrakt. Wie Holtz und Credner fanden, kommt es nach gleichzeitiger Adrenalin-Yohimbininjektion zu einer primären Diuresesperre, deren Ursache in der Umkehr des Adrenalinkreislaufeffektes liegen dürfte. Nach Lösung der Sperre bricht nun aber die Adrenalinwirkung nicht etwa anschließend noch durch, sondern bleibt ausgelöscht. Denn *Yohimbin* hat nicht nur die „Kreislaufwirkung", sondern — wie unsere Versuchsergebnisse belegen — auch die „Gewebswirkung" des Adrenalins, d. h. seine kochsalzmobilisierende Wirkung aufgehoben und damit die auslösende Ursache für die

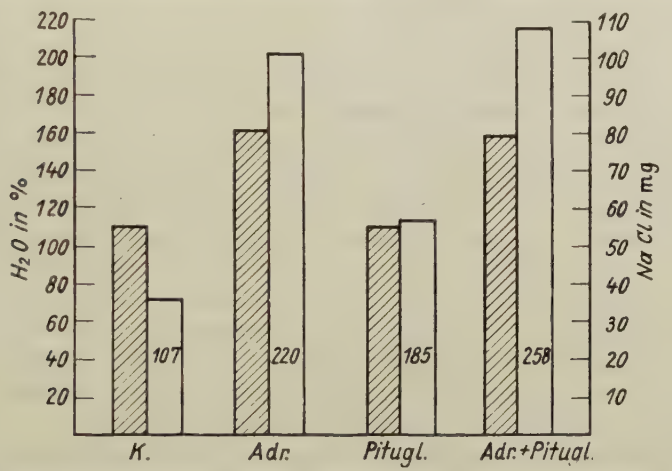


Abb. 4. Meerschweinchendiurese nach Adrenalin und Pituglandol (4-Stunden-Werte, Versuchsbeispiel). Wasserausscheidung in Prozent der verabfolgten Wassermenge ▨, Kochsalzausscheidung in mg ▭, Zahlen = mg-% NaCl. *K.* Kontrolle (Meerschweinchen Nr. 9, 630 g); *Adr.* 500 γ/kg Adrenalin (Meerschweinchen Nr. 38, 570 g); *Pitugl.* 0,1 V.E./kg Pituglandol (Meerschweinchen Nr. 34, 570 g); *Adr.* + *Pitugl.* 500 γ/kg Adrenalin + 0,1 V.E./kg Pituglandol (Meerschweinchen Nr. 46, 540 g).

sonst bei Adrenalininjektion so charakteristische „überschießende" Harnsekretion beseitigt. — Demgegenüber erstreckt sich der „sympathicolytische", adrenalinantagonistische Effekt des *Ergotamins* (Gynergen) nur auf die Kreislaufwirkung des Adrenalins: Wie nach *Yohimbin*, so kommt es bei den „Adrenalintieren" auch nach *Ergotamin* zur Diuresesperre. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Yohimbin bleibt in denen mit Ergotamin die durch Adrenalin bedingte „überschießende Harnsekretion" nicht nur bestehen, sondern erfährt womöglich noch eine Verstärkung, da Ergotamin selbst — ähnlich wie Adrenalin — Kochsalzmobilisation und Harnflut verursacht.

Die von uns in Versuchen mit *Meerschweinchen* beobachtete starke diuretische Wirkung von Ergotamin, unter der es zur Ausscheidung von Harnmengen kam, die mitunter die verabfolgten Wassermengen um mehr als 100% übertrafen, steht in einem gewissen Gegensatz zu

Versuchsergebnissen anderer Autoren, die, wie z. B. Arnstein und Redlich[7] am *Hund*, oder Kaufmann und Kalk[8] am *Menschen* nach Ergotamin keine Förderung der Diurese beobachteten. Scheint somit die *Tierart* von ausschlaggebender Bedeutung für den Ergotamineffekt zu sein, so ist andererseits bemerkenswert, daß die beiden Alkaloide Ergotamin und Ergotoxin an *ein und derselben* Tierart, nämlich am Meerschweinchen, so verschieden wirken. Denn in den früheren Versuchen von Holtz und Credner war Ergotoxin, sogar in weit höheren Dosierungen als wir sie für Ergotamin benutzten, ohne jede nennenswerte Eigenwirkung.

Auch bei der Aufhebung der von *Pituglandol* verursachten Diuresesperre durch Adrenalin scheint die Kochsalzmobilisierung eine Rolle zu spielen. Die Sekretionshemmung nach Hypophysenhinterlappenextrakten ist, wie heute allgemein angenommen wird, vornehmlich *renal* bedingt, indem es in den Nierentubulis wahrscheinlich zu einer beschleunigten Rückresorption kommt[9]. Durch Injektion oder perorale Verabfolgung von Kochsalzlösungen kann diese Hemmung durchbrochen werden[10]. Das vermehrt zur Ausscheidung gelangende Kochsalz setzt der Rückresorption durch Erhöhung des osmotischen Druckes in den Nierentubulis einen größeren Widerstand entgegen und bedingt dadurch eine erhöhte Wasserausscheidung. Wir selbst haben in mehreren Versuchen durch perorale Verabfolgung von 1%iger Kochsalzlösung den antidiuretischen Pituglandoleffekt aufheben können.

Wir halten es deshalb für wahrscheinlich, daß die durch *Adrenalin* veranlaßte Kochsalzmobilisation im Gewebe die Ursache für die Unterdrückung der antidiuretischen *Pituglandolwirkung* bei gleichzeitiger Injektion der beiden Hormone ist.

Zusammenfassung.

1. Nach Injektion von 500 γ/kg *Adrenalin* kommt es am Meerschweinchen zu einer starken Erhöhung der *Wasser-* und *Kochsalz*ausscheidung. Trotz der großen Harnmengen ist die Kochsalz*konzentration* des Harns um 50—60% höher als bei den Kontrollen.

2. Die Wirkung des Adrenalins auf Wasser- und Kochsalzausscheidung läßt sich durch *Yohimbin* aufheben. Die durch Yohimbin verursachte Diuresesperre tritt auch in Versuchen mit *Ergotamin* (Gynergen) auf. Nach Lösung der Sperre holt die Diurese jedoch im Ergotaminversuch auf, so daß am Ende des Versuches Wasser- und Kochsalzausscheidung gleich hohe Werte erreicht haben wie in den Vergleichsversuchen mit Adrenalin allein. Im Gegensatz zu Yohimbin besitzt Ergotamin am Meerschweinchen eine starke, der Adrenalinwirkung vergleichbare salzmobilisierende *Eigenwirkung*, die sich zu der gleichsinnigen Wirkung des Adrenalins hinzuzuaddieren scheint.

3. Die antidiuretische Wirkung von Hypophysenhinterlappenextrakten wird durch Adrenalin aufgehoben. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die durch Adrenalin bewirkte Mobilisierung von Kochsalz, denn die Hypophysin-Antidiurese läßt sich ebensogut wie durch Adrenalin durch perorale Verabfolgung von Kochsalzlösung anstatt reinen Wassers unterdrücken.

Literatur.

[1] Holtz, P., K. Credner u. F. Heepe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 85 (1947). — [2] Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 180 (1949). — [3] Biberfeld, J.: Pflügers Arch. **119**, 341 (1907). — [4] Frey, W., W. Bulcke u. P. Wels: Dtsch. Arch. klin. Med. **123**, 163 (1917). — [5] Stransky, E.: Biochem. Z. **133**, 434 (1922). — [6] Falta, W., L. H. Newburgh u. E. Nobel: Z. klin. Med. **72**, 97 (1911). — Falta, W.: Verh. Kongr. inn. Med. **1909**, 405. — [7] Arnstein, A., u. F. Redlich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **97**, 15 (1923). — [8] Kaufmann, F. u. H. Kalk: Z. exper. Med. **36**, 344 (1923). — [9] Cushny, A. R.: Die Absonderung des Harns. Jena: Gustav Fischer 1926. — [10] Oehme, K.: Dtsch. Arch. klin. Med. **127**, 261 (1918). — Molitor, H., u. E. P. Pick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **97**, 317 (1923).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 500—524 (1949).

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. Letterer).

Versuche über Bedeutung des Vitamin A für Entstehung und Verhütung der Amyloidose.

(Zugleich ein Beitrag zur Pathologie des Vitamin A.)

Von

Erich Letterer.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. August 1948.)

Das Interesse des Morphologen und Biologen an der Amyloidkrankheit hat sich seit den Tagen Virchows zwar wesentlich gewandelt, aber nicht vermindert. Diese merkwürdige Erkrankung tut sich kund in einer ubiquitär möglichen, vorwiegend aber in den Geweben von Milz, Leber, Nieren, Lymphknoten sich abspielenden Ablagerung von mit besonderen Eigentümlichkeiten ausgestatteten Eiweißsubstanzen, welche mit der Ablagerung das arteigene Gewebe zum Schwund bringen und dieses dadurch fast ersetzen. Fesselte vorerst diese Erscheinung den speziellen morphologischen Pathologen, so gewann sie immer mehr an Bedeutung für die allgemeine Biologie und Pathologie, seitdem es gelang, diesen Zustand (an der Maus) experimentell zu erzeugen und seine Entstehungsbedingungen zu studieren. Es gelingt relativ leicht, durch Erzeugung von Gewebseinschmelzungen oder Injektionen eines Eiweißkörpers — am besten kombiniert man beides — Mäuse amyloidkrank zu machen; wir benutzen am meisten eine Lösung von Nuklein oder Kasein in 0,25—0,3%iger Natronlauge (0,3 cm^3 täglich). Die Bildung des Amyloideiweißes steht, wie wir heute wissen, in enger Beziehung zur Eiweißbildung des Organismus überhaupt und zur Bildung der Serumeiweißkörper und der Antikörper im besonderen (s. hierzu Letterer[1, 2, 3]).

Unter Bezug auf die an anderen Orten (Letterer[2, 3]) gemachten Ausführungen über die Möglichkeit, die Entstehung der Amyloidose als Ausdruck schlechter Antikörperbildung des Organismus durch Ernährungsänderungen zu beeinflußen, wurde in den hier zu schildernden Versuchen die experimentelle Amyloidose der Maus und ihr Verlauf unter Vitamin-A-Zugabe und -Entzug untersucht.

Arbeiten, welche sich auf die Bedeutung der „Infektionsabwehr" durch Vitamin A beziehen, gibt es in nicht geringer Zahl, aber gerade dies ist wohl ein Beweis für noch manche Unentschiedenheit auf diesem Gebiet. Neben einer großen Zahl, die sich hinsichtlich dieser „Infektionsabwehr" in positivem Sinne äußern, sagt z. B. Glanzmann abschließend

in einer größeren Studie über die Bedeutung des Vitamin A: „Die Bezeichnung des Vitamin A als eines antiinfektiösen Vitamin hat sich als ebenso übertrieben herausgestellt wie seine Charakterisierung als das eigentliche Wachstumsvitamin." Für die Literatur sei auf die Arbeiten von Glanzmann, Jusatz, Werkman, Thoenes, Bieling, Oelrichs, Kollath verwiesen, in denen sich alle weiteren wichtigen Ergebnisse zitiert finden.

Spricht man von „Infektionsabwehr", so schließt dieses Wort einen doppelten Begriff in sich, denjenigen der Resistenz und denjenigen der Antikörperbildung. Beide können zusammen oder einzeln die Abwehr einer Infektion bedingen, und viele Autoren sprechen dem Vitamin A eine besondere und vorwiegende Resistenzsteigerung gegenüber Infektionen aller Art zu [McCluny and Winters, Werkman, Pfannenstiel und Scharlau, Jusatz (1934), Oelrichs].

Dabei ist aber den meisten dieser Versuche eigentümlich, daß die Wirkungsweise des Vitamin A mehr im Negativen, im Entzug und der dem Entzug folgenden Resistenzschwäche zu sehen ist als im Positiven, der Resistenzverbesserung bei Zugabe von Vitamin A. Meines Erachtens darf der gleiche Schluß nicht aus jedem der beiden Versuche gezogen werden. In Beziehung zu unserem eigenen Problem interessiert nun lediglich die Antikörperbildung als eine Möglichkeit der Infektabwehr und hier speziell die Präzipitinbildung unter Vitamin-A-Wirkung. Wenn schon Werkman 1923 keine Änderung bei Mangelkost an den Präzipitinen gegen Serumeiweiß bei Kaninchen feststellen konnte, so kommt Jusatz zu etwa den gleichen Ergebnissen.

Methodisch muß besonders zwischen den zwei ebengenannten Möglichkeiten unterschieden werden, Vitaminentzug und seine Folgen und luxurierende Zugabe des Vitamin zur Standardkost; denn es ist ein Unterschied, ob bei einem Infekt oder einem Vorgang, der die Immunkörperbildung in Gang setzt, eine überschüssige Vitaminmenge zur Verfügung steht, welche, einem möglichen Mehrverbrauch entgegenkommend, auf die Immunkörperbildung verbessernd wirkt, oder ob man den Körper durch qualitative Mangelernährung an Vitamin verarmen läßt, um ihn dann einem Infekt oder einem die Immunkörperbildung auslösenden Vorgang auszusetzen.

Man hat häufiger dieses zweite Experiment angestellt, um die Avitaminose in ihrer Auswirkung auf einen Infektionsablauf zu prüfen; aber es ist wenig bedacht worden, daß allen diesen Experimenten ein nicht vermeidbarer, von den natürlichen Vergleichsbedingungen nicht unbeträchtlich abweichender Fehler anhaftet; denn das den Tieren gereichte vitaminfreie Futter muß man als unnatürlich schlechthin bezeichnen. Aus verschiedenen Zerealien oder deren Produkten zusammengestellt, ist es als solches kalorisch völlig zureichend, hat aber doch den großen Nachteil, daß — am praktischen Beispiel der Vitamin-A-freien Kost gesehen — dasselbe aus Kasein, Reisstärke, Hefe und Salzmischung bestehend,

niemals der Kost der Vergleichstiere gleichgestellt werden kann, die etwa mit einer Kost aus Reis, Brot, Fleisch, Gerste, Roggen, Weizen, Hanf, mit Garnelen und Sonnenblumenöl gefüttert werden. Ist dieses letztere ein Naturfutter kate-xochen, so ist das erstere ein Vitamin-A-freies Kunstfutter ersten Ranges, und es ist zu fragen, ob nicht schon ein solches Kunstfutter allein genügt, eine Minderung der Resistenz oder Immunkörperbildung zu bewirken. Neuere Versuche von Kollath scheinen mir in der gleichen Richtung zu laufen und meiner Ansicht Recht zu geben. Somit müßte die Forderung gestellt werden, daß Vergleiche zwischen Versuchen nur bei gleichem Grundfutter angestellt werden dürfen. Man würde also normales Grundfutter mit und ohne Vitamin-A-Zusatz zu vergleichen haben und Vitamin-A-freies Kunstfutter, das im Kontrollversuch durch Vitamin-A-Zusatz entsprechend komplettiert wird.

Diesen theoretischen Überlegungen entsprechend benutzte die technische Ausführung der Versuche 2 Wege: Die Zugabe von abgestuften Mengen von Vitamin A zur normalen Nahrung bei amyloidkrankmachender Behandlung (I) und die Verabreichung von Vitamin-A-freier Kost während oder schon vor einer solchen (II).

Teil I.

Die Wirkung von Vitamin-A-Zufütterung auf das Amyloidexperiment.

Nach den bisherigen Erfahrungen experimenteller Arbeiten sind Vitamin-A-haltige Konzentrate keine indifferenten Stoffe für unsere als Versuchstiere benutzten kleinen Nager und sind insbesondere Mäuse gegen Überdosierungen von Vitamin A sehr empfindlich. Nach Bomskov soll die Fütterung von 120000 IE (= 40000 RE = 1 cm^3 Vogan) innerhalb von 8 Tagen den Tod einer Versuchsmaus hervorrufen; nach Moll, Domagk und Laquer beträgt die tödliche Dosis sogar nur 20000 RE.

Dementsprechend wurde zunächst ein Vogan-Tötungsversuch angestellt, der zu der überraschenden Erkenntnis führte, daß die *Art des Grundfutters*, welches mit der Vogandarreichung gegeben wurde, mitbestimmend für den Erfolg des Vogan-Tötungsversuches ist. Während es mit Hafer nicht gelang, die Tiere mit einer durch 8 Tage gleichzeitig gereichten Dosis von insgesamt 1 cm^3 Vogan (= 120000 IE) zu töten, gingen sie bei Verwendung einer sog. A-Zuchtkost zugrunde.

Diese Vitamin-A-Zuchtkost ist ein an A-Vitamin sehr armes, wenn nicht völlig freies Kunstfutter, das aus 300 g Weizenmehl, 165 g Trockenvollmilch, 30 g Kasein, 7 g Trockenfleisch, 6 g Kochsalz, 8 g Kalziumkarbonat besteht. Die Zusammensetzung des vornehmlich zur *Aufzucht* von Tieren für Vitaminversuche gebrauchten Futters richtet sich nach den von Sherman gegebenen Vorschriften für Ratten ($^1/_3$ Vollmilchpulver, $^2/_3$ Weizenvollmehl, 10% an Fleisch und 2% des Weizengewichtes an Kochsalz) unter Berücksichtigung des für Mäuse notwendigen höheren Eiweiß- und Salzbedarfes (Bomskov).

Daß hier schon eine gewisse Mangelkost vorliegt, zeigt ein Vergleich von Normaltieren (Haferfütterung) und A-Zuchtkosttieren (AZK), Wachstum und Reife sind bei den letzteren, unabhängig von der Wurfzahl, die naturgemäß in der Aufzucht eines Stammes maßgeblichen Einfluß hat, stark verzögert. Normaltiere erreichen etwa nach 7—8

Wochen ein Gewicht von 20 g, die AZK-Tiere benötigen dazu 12 Wochen. Von der 3. bis zum Ende der 6. Woche nehmen die Normaltiere bis zu 220% ihres Anfangsgewichtes zu, die anderen um höchstens 138%. Weitere Vergleiche wurden während einer mehrere Wochen dauernden Fütterungszeit mit reiner AZK sowie Zusatz von Vogan einerseits, Sesamöl andererseits angestellt.

Dabei führte die AZK zu keiner sehr guten Zunahme, bei Männchen mittleren Gewichtes sogar zur Abnahme. Wurde sie mit 50—100 Einheiten Vogan komplettiert, so erfolgte geringe Zunahme, über 150 Einheiten bewirken schon 16% Abnahme, sind also als toxisch anzusehen. Entsprechende Mengen Sesamöl bewirkten allerdings in 5 Wochen etwa die gleiche Zunahme, eine Feststellung, die den Wert der Vogankomplettierung stark einschränkt.

In den Versuchen mit AZK, deren Durchführung sich auf einen Zeitraum von mehreren Jahren verteilt, in denen die einzelnen Komponenten dieser Kunstnahrung auch aus verschiedenen Gegenden bezogen wurden, stellte sich noch eine Wirkung dieser Kost heraus, die völlig unbeabsichtigt war. Während Fruchtbarkeit und Wachstum der Tiere in den ersten Jahren noch als befriedigend angesehen werden konnten, wurden diese späterhin immer mangelhafter, und heranwachsende, aber auch größere Tiere bekamen bei längerer Fütterungsdauer schwere Anämien mit einem stark verminderten Hämoglobin. Die Sektion ergab, insbesondere bei Tieren, die noch in der Wachstumsphase auf diese Kost gesetzt worden waren, eine auffallende, homologe *Hypertrophie des Herzens*, etwa in der gleichen Form, wie dies erstmals von M. B. Schmidt bei *eisenarmer Ernährung* von Mäusen außerordentlich eindrucksvoll beschrieben worden ist. Die Prüfung des Hämoglobingehaltes des Blutes zeigte denn auch, daß dieser sehr bald nach dem Beginn der AZK-Fütterung stark abfällt und bis auf unter 50% sich vermindern kann. Dementsprechend muß man diese Erscheinungen als eine Eisenmangelfolge ansprechen, wobei es durch Zufütterung von Eisen in der Form von Protoferrol bei erwachsenen Tieren zwar gelingt, den Hämoglobinspiegel etwas zu heben, aber nicht wieder auf die alte Höhe zu bringen, genau so wie es nicht gelingt, sein Absinken durch protektive Eisenfütterung aufzuhalten. Dies liegt vielleicht daran, daß das erwachsene Tier eine weniger gute Reaktionsfähigkeit besitzt als das noch wachsende, bei welchem M. B. Schmidt durch Zufütterung von Eisen nicht nur eine sofortige Besserung des Hämoglobins, sondern auch raschen Wachstumsanstieg hatte erzielen können. Meine Beobachtungen bestätigen die Befunde M. B. Schmidts besonders hinsichtlich der eigenartigen Herzhypertrophie bei eisenarmer Fütterung nun auch für Tiere gegen Ende des Wachstums.

Die obengenannte Beobachtung der wechselvollen Wirkung des Vogans bei Anwendung verschiedenen Grundfutters steht in Übereinstimmung mit den Feststellungen von Kollath, der als Ergebnis seiner ausgedehnten systematischen Vitaminstudien immer wieder den eigentümlichen Synergismus der einzelnen Nahrungsbestandteile und der einzelnen Vitamine untereinander betont und die Wirkung des Entzuges oder der Zugabe eines bestimmten Vitamins abhängig macht von Gegenwart oder Abwesenheit wiederum bestimmter Nahrungsbestandteile und Vitamingruppen. Vielleicht ist der relative Mangel an B-Vitamin bei sehr kohlenhydrathaltiger Nahrung bedeutsam für die Unterschiede in unseren Versuchen.

Die Tiere erhielten zu der AZK innerhalb von 8 Tagen 1 cm³ Vogan; um auf diese Menge zu kommen, wurden täglich 0,1, am 5. und 6. Tage aber je 0,2 cm³ gegeben. Einige Kontrollen bekamen jeweils die gleiche Menge Sesamöl. Als *Resultat* ergibt sich, daß nicht, wie erwartet, alle Tiere starben, sondern nur 14 von 26 (= 54% ± 9,7%)[1], ferner, daß Männchen wesentlich empfindlicher gegen Vogan zu sein scheinen als Weibchen, was sich in allen 3 Versuchsserien zeigte, denn von den spontan gestorbenen 14 Tieren sind 10 Männchen.

Wenn die Tiere nicht mit AZK, sondern mit Hafer gefüttert wurden, verbesserte sich die Absterbequote gerade bei den sonst empfindlicheren Männchen nicht unwesentlich. Von 5 mit AZK gefütterten Männchen starben alle innerhalb 11 Tagen nach einer Höchstgabe von zusammen

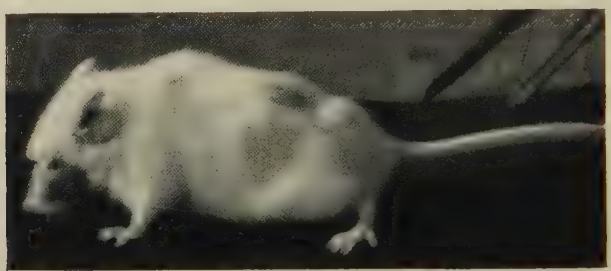


Abb. 1. 0,1—0,2 cm³ Vogan täglich (je Woche 1 cm³) für 3 Wochen Dauer bei Hafer als Grundkost. Stärkste Abmagerung, allgemeine Atrophie, Haarverlust um die Schnauze.

1,3 cm³ Vogan, während bei Haferfütterung bis dahin alle Tiere überlebten. Auf diese Art kann man auch erheblich mehr als 1 cm³ Vogan verabreichen; bis zu ihrem Tode erhielten die Tiere bis zu insgesamt 2,4 cm³. Dabei entwickelten sich dann bei allen Versuchstieren die Zeichen der Vitamin-A-Überdosierung in derselben Form, wie sie schon von früheren Autoren eingehend beschrieben worden sind: Stärkste Abmagerung, atrophisches braunes Fettgewebe, atrophische kleine Milz, verkleinerte Leber, lipoidarm gewordene Nebennieren. Schon bald nach der 1. Woche der Fütterung treten als Zeichen der Hypervitaminose eigentümliche und ausgedehnte Enthaarungen um die Schnauze auf (Abb. 1). Die gelegentliche Verschmierung von Vogan um die Schnauzengegend, die bei der Sondenfütterung nicht zu vermeiden ist, kann der Grund für diesen Haarverlust nicht sein, da wir wochenlang um die Schnauze und an anderen Stellen Vogan und Sesamöl eingerieben haben, ohne jemals Derartiges zu beobachten. Auch treten die Veränderungen an der Schnauze nach einfacher Sesamölfütterung nicht auf.

[1] ± 9,7 ist die Berechnung der mittleren Abweichung eines Wirkungsprozentsatzes nach der Formel $\sqrt{\frac{p \cdot g}{N}} \cdot q = 100\text{-}p$, N = Tierzahl des Versuches (s. BURN, Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937, S. 28).

Das Vogan wird mit Bestimmtheit wenigstens zum Teil auch von der Haut aus zur Resorption gebracht (s. hiezu Helmen und Jansen); dies läßt sich an der Gesamtwirkung auf das Tier im sog. Schmierversuch feststellen (Abb. 2). Die Sternzellenverfettung der Leber, die als Folge von Voganfütterung aufzutreten pflegt, erscheint nach Voganeinreibung ebenfalls. Beginnt allerdings dann die Atrophie und die zunehmende Abmagerung, so schwindet nach meinen Beobachtungen auch das Fett in den Sternzellen wieder, um einem feinkörnigen, dunkelbraunen, eisenfreien Pigment als Restprodukt Platz zu machen. Bis auf diese beiden Feststellungen decken sich meine Beobachtungen mit denjenigen von Domagk, Nötzel, Laubmann u. a.

Abb. 2. Links: 8 Wochen lang täglich 0,1—0,2 cm³ Vogan in das Rückenfell eingerieben. Gewichtssturz von 18 g auf 11 g, schwere Haut- und Enthaarungsstörungen am Gesichtsschädel. Rechts derselbe Versuch mit Sesamöl allein. Zunahme von 17 g auf 22 g.

Konnte man nach diesen Vorversuchen bei einer Dosis von 1,0 cm³ Vogan je Maus in 8 Tagen Gewichtsabnahmen bis über 5 g und verschiedenartige Schäden an den Organen, aber bei weitem nicht in allen Fällen den Tod der Versuchstiere erwarten, so sollte in den nun folgenden Versuchsreihen der Einfluß geringer und steigender Mengen Vogan bei gleichzeitiger amyloidkrankmachender Behandlung geprüft werden. Vorversuche hatten ja gezeigt, daß die Mäuse bei einer täglichen Gabe von 50 bis zu 150 IE je Tag ihr Gewicht durchschnittlich unverändert halten, innerhalb dieser Dosis also eine schädliche Wirkung des Vogan nicht angenommen werden kann.

Da der Versuch der Frage dienen sollte, ob die *Amyloidose* durch *Voganfütterung* zu *verhindern* sei, so wird er als „Vogan-Schutz"-Versuch gegenüber dem obengenannten „Vogantötungsversuch" bezeichnet.

Für diesen Versuch wurden die zwei schon im Vorversuch gebrauchten Kostformen, A-Zuchtkost und Hafer, angewandt. Steigende Mengen von Vitamin A (alle 2 Tage die doppelte Tagesmenge) wurden in verschiedenen Versuchsreihen mit Sondenpipette verabreicht, das Grundfutter wurde 5 Tage zuvor schon gegeben und dann gleichzeitig mit Vogan und der Nukleinspritzenbehandlung begonnen (12 Spritzen 2%iges Nuklein gelöst in 0,25%iger NaOH, 0,5 cm³ subkutan am Rücken während 21—22 Tagen. 1.—5. Injektion täglich, dann je 1 Tag Pause zwischen den Injektionen). Dabei entwickeln sich unter der Rückenhaut

mehr oder weniger schnell Abszeßbildungen, die nicht selten auch zur Nekrose der Haut führen. Es fällt auf, daß auch bei ganz gleichmäßiger Injektionsbehandlung die Abszeßbildung und Nekrose verschieden stark ist und von bestimmten Nebenumständen, dem Grundfutter usw., abzuhängen scheint.

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das *Hauptergebnis* dieses Versuches ist die Feststellung, daß es weder mit kleinen, noch mit großen Mengen Vitamin A gelingt, die Totalverhinderung einer Amyloidose zu erreichen, also einen Vollschutz zu bewirken. Die geringste verabreichte Tagesmenge von 0,01 cm³ Vogan beläuft sich im 21tägigen Versuch auf 25200 Einheiten insgesamt und 8400 Einheiten je Woche; wenn die tödliche Menge bei 120000 Einheiten in 8 Tagen liegt, so befindet sich die verabreichte Wochenmenge, die nur den 14. Teil der tödlichen Dosis beträgt, also weit außerhalb der Schadensmöglichkeiten. Die Amyloidrate in diesem Versuch (Tabelle 1) beträgt 59% (± 11,9%) gegenüber 51% (± 7,9%) bei AZK-Fütterung ohne Vogan. Unter Berücksichtigung der mittleren Abweichung von diesen Wirkungsprozentsätzen erkennt man, daß die Werte keinen signifikanten Unterschied in sich tragen. Der Voganfütterung kommt mit dieser Dosierung also keine Wirkung auf die Amyloidose zu. Auf die Unterschiede in der Beteiligung männlicher und weiblicher Tiere an der Amyloidrate wird noch zurückzukommen sein.

In der Annahme, daß die künstlich zusammengesetzte AZK gegenüber einer natürlichen Nahrung immerhin einen nachteiligen Einfluß ausüben könnte, wurden die Versuche nun mit Haferfütterung fortgesetzt. Der Prozentsatz der Amyloidose bleibt derselbe mit 59% (± 9,8%) bei täglicher Vogangabe von 0,02 cm³. Verglichen mit dem Wirkungsprozentsatz bei reiner Haferfütterung ohne Vogan von 55% ist auch hier noch kein Unterschied zu finden. Gleiches gilt für die Mengen 0,06 und 0,08 cm³ Vogan täglich. Zwar sinkt der Wirkungsprozentsatz scheinbar ab, aber die mittlere Abweichung ist in Anbetracht der kleinen Zahlen doch so groß, daß Unterschiede zur Haferfütterung ohne Vogan nicht vorhanden sind.

Erst die Dosis von täglich 0,1 cm³ Vogan, also eine eigentlich tödliche und sicher *un*physiologische Menge, bringt eine *Senkung* der Amyloidrate hervor, welche der Kritik einigermaßen standhält. Sie liegt bei 45% (± 7,1) und außerhalb des Wirkungsprozentsatzes bei der Haferfütterung.

Die *Ausbreitung* der Amyloidose auf die einzelnen Organe ist am geringsten bei Haferfütterung mit 0,02 cm³ Vogan; mit einer Ausnahme steigt der „Ausbreitungsquotient" mit zunehmender Voganmenge an; d. h. also die Amyloidrate selbst nimmt ab, kommt es aber zur Amyloidose, dann ist ihre Ausbreitung im Organismus größer.

Der Stärkefaktor ist bei der AZK größer als bei der Haferfütterung im übrigen sinkt er mit steigender Vogandosierung, d. h. also er verhält

Tabelle 1. *Voganschutzversuch.*

0	1	2	3	4	5	6	7	8
Vogan cm³/ 2 Tage IE/ 2 Tage IE gesamt	Gesamt ♂ ♀	Davon amyloid + ♂ ♀	% ♂ ♀	Mittlere Abweichung (σ) ♂ ♀	Organbeteiligung	Ausbreitungsquotient q	Amyloidstärkegrad der Milz	Stärkefaktor s
A-Zucht-Kost.								
0,02	17	10	59	11,9	Mi 10		+++ =3	
2400					Le 7		++ =4	6
25200	9 8	3 7	33 87	15,7 11,9	Ni 0	170	+ =3	70
							(+) =0	
0,0	41	21	51	7,9	Mi 21		+++ =4	
					Le 12	176	++ =10	28,5 5
	10 31	7 14	70 45	14,5 8,9	Ni 4		+ =6	
							(+) =1	
Haferfütterung.								
0,04	27	16	59	9,8	Mi 16		+++ =1	
4800					Le 2	112,5	++ =4	31 4
57600	14 13	9 7	64 54	12,8 13,9	Ni 0		+ =8	
							(+) =3	
0,12	15	7	47	12,9	Mi 7		+++ =1	
					Le 1	112,8	++ =1	28 3
	7 8	3 4	43 50	18,7 17,7	Ni 1		+ =3	
							(+) =2	
0,16	8	4	50	17,7	Mi 4		+++ =0	
					Le 0	100,0	++ =1	25 2
	3 5	2 2	66 40	27,3 21,9	Ni 0		+ =1	
							(+) =2	
0,2	49	22	45	7,1	Mi 22		+++ =4	
					Le 3	118,8	++ =2	27 1
	24 25	13 9	54 36	10,1 9,6	Ni 1		+ =12	
							(+) =4	
0,0	144	79	55	4,1	Mi 79		+++ =9	
					Le 25	136,7	++ =18	34 0
	88 55	36 43	40 78	5,3 5,7	Ni 4		+ =38	
							(+) =14	

Amyloiderzeugung in 21tägiger Versuchsdauer bei Haferfütterung und AZK mit steigenden Voganmengen.

Erläuterung der Einzelsäulen: Horizontal 0 = verabreichte Voganmenge, welche 2tägig und während der Gesamtversuchsdauer gegeben wurde in Kubikzentimeter und Voganeinheiten. 1 = Zahl der Versuchstiere insgesamt, dazu ♀ und ♂. 2 = Zahl der amyloidkrank gewordenen Tiere insgesamt und nach ♂ und ♀ getrennt. 3 = Prozentuale Berechnung des Ergebnisses. 4 = Berechnung der mittleren Abweichung (σ) für Gesamtprozente sowie der ♂ und ♀ Prozentzahlen. 5 = Feststellung der Organbeteiligung der Amyloidose nach Milz, Leber und Niere. 6 = Quotient q als Amyloidausbreitungsfaktor steigt die Ausbreitung, so steigt die Quotientenzahl. 7 = Amyloidstärkegrade der Milz. 8 = Amyloidstärkefaktor s (s. Letterer 2).

sich gegenläufig zum Ausbreitungsfaktor und gleichlaufend zur Amyloidrate, nimmt die Amyloidrate ab, dann nimmt auch die Stärke des Amyloids im Einzelfalle ab.

Die *Verminderung* der *Amyloid*entstehungsneigung, welche damit bei *hoher Vogandosierung* zum Ausdruck kommt, wird bei Vergleich der Faktoren für die Organausbreitung (q) und die Amyloidstärke (s) mit denjenigen bei reiner Haferfütterung deutlich. Wenn sie dort 118 beträgt, so steigt sie ohne Vogan auf 137 und der Stärkefaktor von 27 auf 34. *Ohne Vogangaben ist also sowohl die Organausbreitung wie die Stärke der Amyloidose eine höhere.*

Der Gesamtversuch bekommt ein noch anderes Bild, wenn man die Verteilung der Amyloidose auf die männlichen und weiblichen Tiere vergleichend untersucht. Es war erstmals bei der AZK-Fütterung aufgefallen, daß die Verteilung der Amyloidose auf das Geschlecht der Mäuse eine verschieden starke war. Wenn z. B. mit dieser Kost gefütterte Versuchstiere unter den Männchen eine Amyloidrate von 70% ($\pm$ 14,5%) ergaben, so erkrankten die Weibchen nur zu 45% ($\pm$ 8,9%). Im Gegensatz dazu zeigt die Haferfütterung eine Bevorzugung der Weibchen bei der Erkrankung mit 78% und mit 40% Männchen, also nahezu umgekehrt. Diese Feststellung erscheint besonders wichtig.

Wird nun zu der AZK Vogan gegeben, so kehrt sich die Prävalenz in der Amyloidrate der Männchen in eine solche der Weibchen um. Jetzt erkranken 87% ($\pm$ 11,9%) Weibchen gegenüber 33% ($\pm$ 15,7%) Männchen. Sesamöl allein mit AZK kann diese Umstellung nicht bewirken. Demgegenüber zeigt Hafer mit Vogan eine Verringerung der Amyloidrate bei den Weibchen und, in Umkehrung der Umstände ohne Vogan, ein vermehrtes Erkranken der Männchen gegenüber den Weibchen. Die Zufütterung von Vogan in allerdings sehr hohen Dosen vermag also diese merkwürdige Umstellung zuwege zu bringen, das Verhältnis der Geschlechter in der Amyloidrate, welches bei den beiden Futterarten AZK und Hafer schon gegensätzlich ist, nochmals umzukehren nach folgendem Schema:

Ohne Vogan:	A-Zuchtkost	♂ > ♀
	Hafer	♂ < ♀
Mit Vogan:	A-Zuchtkost	♂ < ♀
	Hafer	♂ > ♀

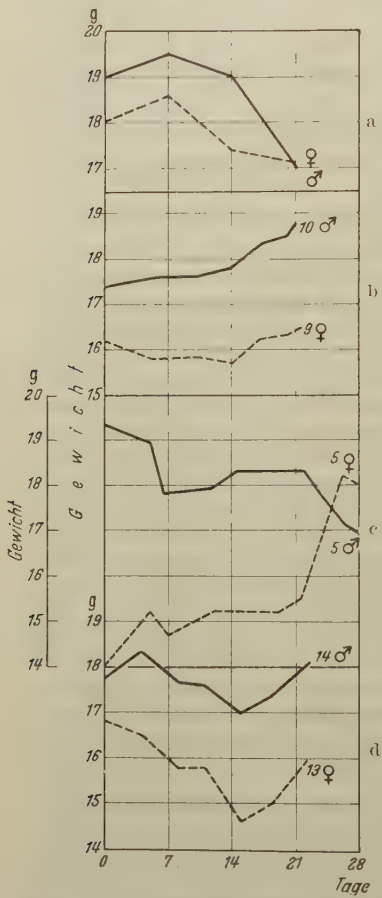
Hieraus ist wiederum zu ersehen, einen wie entscheidenden Einfluß das Grundfutter auf die Wirkung des Vitamin A ausübt. Die kausale Analyse der gefundenen Tatsachen dürfte vorerst schwierig sein. Man wird sie suchen müssen in der allgemeinen Stoffwechselwirkung des Vitamin A und zum anderen in bestimmt gerichteten Einflüssen auf die den Geschlechtsdrüsen untergeordneten Stoffwechselvorgänge.

Von diesen unmittelbar auf die Fragen der Amyloidose zu beziehenden Ergebnissen abgesehen, konnte im Verlaufe dieser Versuche noch eine Reihe von Beobachtungen zur Wirkung des Vitamins A gemacht werden. Man kann feststellen, daß auch schon das Vitamin A allein bei männlichem und weiblichem Geschlecht eine unterschiedliche Wirkung hat. Der schon lange bekannte Kolpo-Keratose-Test erweist die besonderen Auswirkungen auf das weibliche Tier im Falle des Vitaminentzuges. Umgekehrtes, aber wohl sinngemäß Gleiches zeigt der Vitamintötungsversuch bei Überdosierung mit Vogan, gegen welche nun Männchen entschieden empfindlicher sind als Weibchen.

5 Männchen und 5 Weibchen wurden auf Haferfütterung mit täglich 0,02 cm³ Vogan = 2400 IE ohne Injektionsbehandlung gesetzt. Ein Weibchen stirbt 4 Tage vor Versuchsende (an interkurrentem Infekt), die anderen überleben den 28 Tage laufenden Versuch. Gesamtdosis 67200 IE. Sämtliche Weibchen nehmen zu. Die Männchen aber nehmen ab, bei ihnen treten die ersten Zeichen einer Hypervitaminose schon zu einer Zeit auf, zu der die tödliche Dosis sowohl absolut wie relativ erst halb erreicht ist. Es kommt zu struppigem Fall, der Schwanz wird schuppig, am Rücken kommt es zu beginnendem Haarverlust. Der Gewichtsabnahme entsprechen bei der Sektion der Verlust des Fettgewebes und die beginnende Atrophie der Organe, besonders der Milz. Demgegenüber haben die Weibchen glattes schönes Fell, gutes Fettpolster, große Milzen. Die folgende Kurve zeigt die divergierenden Gewichtsverhältnisse sehr deutlich (Kurve 1, Abb. a). Mit Beginn der Voganfütterung fallen die Männchen, obwohl von Anfang an schwerer, im Gewicht ab, während die Weibchen steigen. Besonders deutlich wird dies gegen Versuchsende. Während die Männchen um 15,5% ihres Anfangsgewichtes abnehmen, zeigen die Weibchen eine Zunahme von 26,3%. Eine Kontrolle mit Sesamöl, dem Lösungsstoff des Vitamin A, in gleicher Menge während 22 Tagen verabreicht, zeigt bei 10 Männchen und 9 Weibchen das weitere Kurvenbild (1, Abb. b). Darin fehlt nicht nur der markante Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren, sondern auch der Gewichtsverlust. Männchen und Weibchen nehmen zu, und zwar um 8,1 bzw. 3,7% ihres Anfangsgewichtes.

In eigentümlicher Weise werden nun gewisse Wirkungen des Vitamins A aufgehoben durch eine gleichzeitige amyloidkrankmachende Behandlung. Die in der Tabelle 1 als Voganschutzversuche zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die tödliche Dosis (60—120000 IE je Woche) in dem Versuch mit 0,2 cm³ je 2 Tage erreicht ist. Trotzdem gehen die Tiere, Männchen wie Weibchen, *nicht* zugrunde. Wie die Kurvenbilder der Gewichte zeigen, haben unter dem Eindruck der Injektionsbehandlung die Weibchen ihren Unterschied in der Reaktion gegenüber dem Vogan im Vergleich zu den Männchen eingebüßt (Kurve 1, Abb. c). Bis zum 15. Versuchstag fallen die Tiere beiderlei Geschlechts im Gewicht ab, um dann trotz amyloidkrankmachender Injektionsbehandlung gemeinsam wieder anzusteigen, und zwar gleichartig für Männchen und Weibchen (Kurve 1, Abb. c). Dies trifft sowohl für die amyloidkrankwerdenden wie für die gesund bleibenden zu; nur mit Hafer gefütterte und der Injektionsbehandlung unterworfene Tiere zeigen einen abfallenden Kurvenverlauf (Kurve 1, Abb. d). Während

wir oben sahen, daß Vogan mit Hafer als Grundfutter die Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der *Amyloidrate* umkehrt (Männchen erkranken jetzt mehr als Weibchen) (s. Tabelle 1, Spalte 3), hebt die Injektionsbehandlung die geschlechtsspezifische Wirkung des Vogans auf den Gewichtsverlauf für beide Geschlechter auf (vgl. Kurve 1, Abb. c mit Abb. a) und hemmt bzw. verzögert bei dieser Dosierung außerdem den Eintritt der bei Männchen sonst bald einsetzenden *Hypervitaminose*erscheinungen. Die Wirkung ist also gegensinnig, und zwar jeweils in einem für das Tier günstigen Belang. Vogan drückt bei allerdings hoher Dosierung die Amyloidrate, die amyloidkrankmachende Behandlung aber hemmt die hypervitaminotisierenden Voganwirkungen. Geht man bei gleichzeitiger amyloidkrankmachender Behandlung und Haferfütterung in der Dosierung des Vogans noch nach oben, zu 0,06—0,08 bis 0,1 cm³ täglich, so bleiben die Verhältnisse grundsätzlich die gleichen; die Vogandarreichung wird auch in *tödlicher Dosis überlebt*. Gewichtsstürze sind dann allerdings auch bei den Weibchen vorhanden. Die Atrophie der Organe und der Verlust an Fettgewebe sind zwar trotzdem noch sehr stark, aber nie so erheblich wie bei Voganfütterung ohne Injektionsbehandlung, und es steht fest, daß die *totbringende Wirkung hoher Vogandosen* durch die *amyloidkrankmachende Behandlung zurückgedrängt wird*. Dafür tritt aber bei hoher Dosierung die oben schon geschilderte eigenartige Form der Hypervitaminose unter Umständen schon nach wenigen Tagen und wesentlich verstärkt auf.

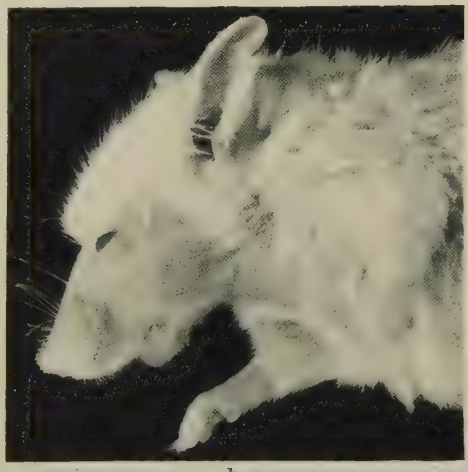


Kurve 1a—d. Gewichtsdurchschnittskurve ♂ und ♀ Tiere in vier verschiedenen Versuchen. a Fütterungsversuch Hafer mit 0,02 Vogan täglich; b Fütterungsversuch Hafer mit 0,02 Sesamöl täglich; c Injektionsversuch bei Hafer und Voganfütterung 0,02 täglich und 12 Injektionen in 21 Tagen. „Vogan-Schutzversuch"; d Injektionsversuch bei Haferfütterung. 12 Injektionen in 21 Tagen.

Die Enthaarung der Schnauze (Schnurrhaare bleiben bestehen!) greift auf Hals, Vorderfußgegend und Augen über, die Tiere haben ein eigentümliches „Clownsgesicht", ganz besonders die weißen Mäuse, deren weißes Fell als

Umrahmung zu der haarlosen, aber hyperämischen roten Haut eigentümlich kontrastiert (Abb. 3a u. b). Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte nicht festgestellt werden. Dabei überstehen die Tiere den Versuch in diesem äußerlich wenig guten Zustande meist erstaunlich, sogar bis 28 statt 21 Tagen mit 2,5 cm^3 Vogan als Gesamtmenge. Bei manchen Tieren bessert sich auffallenderweise gegen Versuchsende der Zustand des Felles etwas, sogar ein feiner neuer Haarflaum kann auf den enthaarten Stellen sich wieder entwickeln, Regulationsvorgänge scheinen also möglich zu sein. Der Organzustand der Tiere mit den hypervitaminotischen Veränderungen der Epidermis ist zumeist gut. Der Befund des Fettgewebes ist noch reichlich, die Organe nicht atrophisch, die Nebennieren groß und lipoidreich. Kontrolltiere aber, die *nicht* gespritzt werden, bilden diese eigenartigen degenerativen Erscheinungen der Epidermis nicht aus, sondern sterben unter den Zeichen fortschreitender schwerster Atrophie mit zunehmendem Gewichtsverlust, Schwund allen Fettgewebes, starker Verkleinerung besonders der Milz und der Leber und kleinen blassen Nebennieren.

a



b

Abb. 3a u. b. a Voganschutzversuch VI mit Tötungsmenge. Hafertiere nach 3 Wochen. „Voganschutzversuch." Verabreichung einer schon für 1 Woche tödlichen Voganmenge für die Dauer von 3 Wochen (Haferfütterung). Zustand am Ende der 3. Woche. Haarverlust um Schnauze, Hals und Gesicht; b Tier aus dem gleichen Versuch, vergrößert aufgenommen.

Eine Analyse dieser Beobachtungen hinsichtlich ihrer inneren Zusammenhänge ist vorerst auch noch nicht annähernd möglich. Möglicherweise spielt die nach Vogandarreichung entstehende Hypercholesterinämie eine Rolle. Offenbar scheiden Hafer-Vogan-Tiere durch die Haut Cholesterin aus, denn ihr Fell wird alsbald struppig, während das der AZK-Tiere auch bei hoher Vogandosierung stets glatt bleibt. Es wäre nicht unmöglich, daß Vogan mit ihm durch die Haut ausgeschieden wird und dabei die geschilderten Schäden zustande kommen.

Zusammenfassung für Teil I.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Der Einfluß verschieden hoher Vitamin-A-Fütterung auf die Entstehung der experimentellen Amyloidose wird untersucht.

2. Als Grundkost wurde ein Kunstfutter, sog. A-Zucht-Kost (AZK), in den meisten Fällen aber Hafer benutzt. Während im Hafergrundversuch regelmäßig mehr Weibchen als Männchen erkranken (40% ♂, 78% ♀), liegt das umgekehrte Verhältnis bei AZK-Fütterung vor. Die AZK führt infolge Eisenarmut des Futters häufig zu einem starken Abfall des Hämoglobins und bei noch wachsenden Tieren zu einer beträchtlichen Herzhypertrophie im Sinne von M. B. SCHMIDT.

3. Der „Vogan-Tötungsversuch" führt bei AZK als Grundfutter mit 120000 IE Vogan unter den üblichen Erscheinungen der Hypervitaminose, d. h. starker Abmagerung, struppigem Fell, Epithelabschuppungen, in etwa 8 Tagen zum Tode, mit Hafer als Grundfutter wird der Versuch viel länger überstanden. Daraus geht die Bedeutung des Grundfutters für den Erfolg von Vitaminexperimenten hervor.

Männchen sind allgemein empfindlicher gegen Vogan als Weibchen, beide divergieren in ihren Gewichtskurven. Geringe Dosen (0,02 cm^3 pro die) führen bei Männchen zu Gewichtsabfall, bei Weibchen zu Gewichtsanstieg, hohe Dosen bei beiden zu Abfall.

4. Der „Vogan-Schutzversuch" mit Injektionsbehandlung und täglicher Zugabe von Vogan von 0,01—0,1 cm^3 ergibt:

a) Senkung der Amyloidrate bei hoher Vogandosierung. Tödliche Folgen der Voganüberdosierung bleiben aus, jedoch entwickeln sich schwerste Hypervitaminoseerscheinungen an der Epidermis, besonders des Kopfes.

b) Bei beiden Grundfutterarten mit Vogan eine Umkehr der Häufigkeitsverteilung in der Erkrankungsquote für Männchen und Weibchen.

c) Die Divergenz der Gewichtskurven zwischen Männchen und Weibchen im Nur-Vogan-Versuch schwindet mit der gleichzeitigen amyloidkrankmachenden Injektionsbehandlung.

5. Amyloidkrankmachende Injektionsbehandlung und Voganwirkung beeinflussen sich also gegensinnig. Die Injektion mindert die Vitamin-A-Überdosierung hinsichtlich der tödlichen Wirkung derselben, führt aber zu schweren degenerativen Hauterscheinungen. Die gleichen Dosen mindern die Folgen der amyloidkrankmachenden Behandlung.

Teil II.

Untersuchungen über Vitamin-A-Entzug und Amyloiderzeugung.

Hatten die vorhergehenden Versuche das Ziel, die Möglichkeit einer Verhütung der Amyloidose bei Zugabe von reinem Vitamin A zur

gewöhnlichen Ernährung (Luxurierungsversuch) zu prüfen, so war es die nächste Aufgabe, die gleichen Verhältnisse bei Entzug von Vitamin A zu untersuchen.

Allen unseren Versuchen, besonders aber den jetzt zu schildernden, haftet eine nicht zu beseitigende Schwierigkeit insofern an, als die Maus nur bedingt tauglich für Vitaminversuche ist, während das hierfür bestgeeignete Tier, die Ratte, wiederum für Amyloidexperimente völlig ungeeignet ist. Es ist bislang noch keinem Untersucher gelungen, bei Ratten eine experimentelle Amyloidose hervorzurufen und ich selbst habe wiederholt in langdauernden und großen Injektionsreihen bei Ratten ohne allen Erfolg versucht, auf die gleiche Weise Amyloid zu erzeugen wie bei Mäusen. So mußte es also bei der Maus verbleiben.

Für die Vitamin-A-freie Ernährung wurde eine Futterzusammensetzung gewählt, welche den Rezepten für Rattenversuche unter Berücksichtigung der für die Maus eigentümlichen Bedingungen nachgebildet war. In Anlehnung an die von Sherman gegebenen Diätvorschriften wurde ein Futter folgender Zusammensetzung gewählt:

Extrahiertes Kasein	35 g
Extrahierte Reisstärke	56 g
Osborne Salzgemisch	7 g
Extrahierte Hefe	2 g.

In 100 g enthält diese Kost 352 Kalorien, der Gesamtnährstoffgehalt ist 84,6 g-%. An Proteinen enthalten 100 g Futter 47,63 g, an Kohlenhydraten 52,73 g. Fett fehlt gänzlich, Salze 8,88 g. Die Vitamine A und C fehlen, D und E sind in Spuren vorhanden, B_1, B_2, B_6 sind zu je 40, 116 und 20 γ enthalten.

Die mit der sog. AZK herangezogenen Tiere wurden nach Erreichung eines Gewichtes von etwa 20 g auf die angegebene Kost gesetzt und nach einer Fütterungsvorperiode von 1—3 Wochen dem üblichen Amyloidexperiment unterworfen.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Erhaltung der Versuchstiere waren denkbar schlechte. Von 84 Tieren haben nur 36 den Versuch überstanden. Etwa 57% starben vor Versuchsende, wobei Männchen wieder anfälliger waren als Weibchen. Es wurde besser, als die Vorfütterungsperiode und damit die Belastung mit einem qualitativ unzureichenden Futter insgesamt abgekürzt wurde.

Die ersten Versuche dieser Art wurden schon in den Jahren 1937/38 begonnen, mußten aber infolge des Krieges zeitweilig unterbrochen werden. In der Zwischenzeit wurde gelegentlich anderer Ernährungsversuche mit künstlich zusammengesetzten Nahrungsgemischen die überraschende Feststellung gemacht, daß Stärke als Träger der notwendigen Kohlenhydrate für die Maus weitgehend unausnutzbar ist und als volle Energiequelle ausscheidet. Ein Umstand, der nicht einmal dadurch wesentlich verbessert wird, daß man die Stärke zur Fütterung mit heißem Wasser verkleistert. Aus einem Teil der gequollenen Stärkekörner wird das Wasser im Darm wieder aufgesogen, das Korn selbst aber nicht verdaut. Die Stärkekörner bleiben mikroskopisch im Kot gut erkennbar, die Jodreaktion daran ist stark positiv. Demgegenüber wird reiner Zucker ausgezeichnet aufgenommen. Ob diese mangelhafte Stärkeverdauung mit der Herstellungsweise der Stärke zusammenhängt, eine mindestens wahrscheinliche Annahme im Hinblick auf die gute Verdaulichkeit der in den nativen Getreidekörnern vorhandenen polymerisierten Kohlenhydrate, konnte nicht untersucht werden. Daß die Tiere mit dem vorliegenden Futtergemisch überhaupt so lange Zeit durchhielten, ist vom Gesichtspunkt der Kalorienversorgung her gesehen nur deshalb möglich,

weil der Proteingehalt des Futters entsprechend dem Bedarf der Maus mit 47,6% relativ hoch war.

Die während dieser Versuche gefundene starke Gewichtabnahme der Tiere geht daher nicht allein auf den Entzug von Vitamin-A zurück.

Zur Kritik der eigenen Beobachtungen scheinen mir die neueren Ergebnisse von W. KOLLATH von Wichtigkeit zu sein, denn unsere Vitamin-A-freie Kost entspricht im wesentlichen der Diät D 18 von KOLLATH [Kasein 20, Reisstärke 60, Erdnußöl 10, K_2HPO_4, dazu täglich 13 γ B_1]. Sie unterscheidet sich nur durch den Mangel an Fett und den Zusatz von OSBORNEscher Salzmischung, welche außer Kalium und Phosphorsäure auch alle weiteren wichtigen Mineralien enthält.

Die Ergebnisse meiner Versuche sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

Tabelle 2. *Amyloidexperiment bei Vitamin-A-freier Fütterung.*

Zahl der Tiere	Davon positiv Amyloid absolut	%	Davon ♂	+	%	Davon ♀	–	%	Ausdehnung	q	Amyloidstärkegrade	s
36 (84)	4	11,1±5,2	17	3	17,6±9,3	19	1	5,3±5,1	Milz 4 Leber 0 Niere 0	100	+++ = 0 ++ = 3 + = 1	75

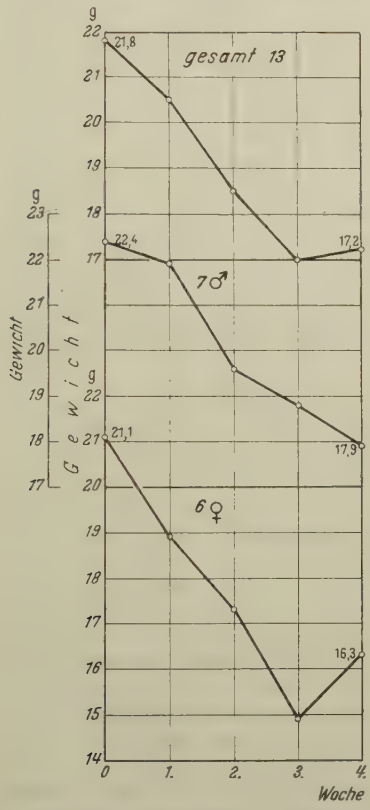
21 Tage Versuchsdauer mit 13 Injektionen, Vitamin-A-freie Vorfütterung 14 Tage bis 4 Wochen. Tiermaterial mit Vitamin-A-Zuchtkost gezogen, zum Teil in erster, zum Teil in zweiter Generation verwandt.

Unter der Voraussetzung, daß bei Vitamin-A-freier Kost die Antikörperbildung leidet, also herabgesetzt werden würde, müßte die Amyloidose im Experiment häufiger werden; wie man sieht, ist das Gegenteil der Fall. Im Vergleich zum Haferversuch sinkt dieselbe ganz beträchtlich von 57% auf 11%; verglichen mit der AZK ist bei Vitamin-A-freier Kost die Amyloidrate auch hier wesentlich niedriger (51%). Während aber die Hafertiere 78% Weibchen unter den erkrankten Tieren hatten gegenüber 40% Männchen, sind, wie bei der AZK, im Vitamin-A-freien Versuch die Männchen unter den erkrankten Tieren im Übergewicht. In dieser Hinsicht verhalten sich die beiden künstlichen Kostformen also gleich, ungeachtet, ob sie nur Spuren oder gar kein Vitamin A enthalten. Dies könnte schließlich bedeuten, daß dem Vitamin A überhaupt keine Bedeutung zukommt.

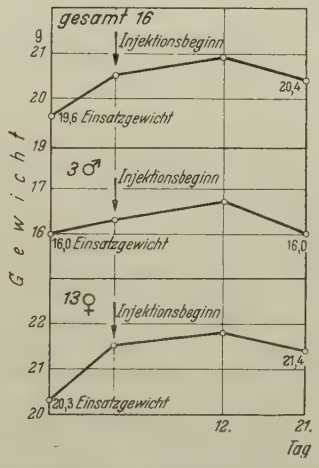
Die *Gewichtskurven* zeigen eine stark abfallende Linie und von der ersten (Vorfütterungs-) Woche bis zur dritten einen Durchschnittsverlust von rund 23%. Diese 23% Abnahme sind hart an der Grenze der erträglichen Abnahme für die Maus. Frühere Versuche mit quantitativen Hungerdiäten haben mir gezeigt, daß eine Abnahme über 25% im allgemeinen nicht mehr vertragen wird. So starben auch in den vorliegenden Versuchen diejenigen Tiere vorzeitig, welche zu schnell die Abnahmegrenze von 25% überschritten hatten. Die Weibchen

machen anscheinend eine Ausnahme, indem sie noch größere Gewichtsabnahmen ertragen, denn wie das Kurvenbild zeigt, stürzen die Weibchen im Gewicht anfänglich noch mehr (29%), um dann durch erneuten Anstieg ebenfalls den Durchschnitt von 23% Gewichtsabnahme zu erreichen (Kurve 2 und 3). Die Quotienten für die Organausbreitung und die Amyloidstärkegrade sind $q = 100$ und $s = 75$, d. h. die Ausbreitung ist geringer als bei Hafer (139) und bei AZK (176), die Stärke des Amyloids ist aber mit 75 größer als bei den Hafertieren (31) und bei dem AZK-Versuch (29). Das befallene Organ wird stärker ergriffen, während die Ausdehnung auf den Gesamtkörper geringer ist.

Abgesehen von der starken Gewichtsabnahme zeigen die Tiere in ihrem *Verhalten während der Versuchszeit* eigentlich keine krankhaften Erscheinungen. Sie sind munter und beweglich, das Fell bleibt glatt, man merkt ihnen keine



Kurve 2. A-freie Kost. 13 durchgestandene Tiere mit geprüftem Gewicht.



Kurve 3. A-Zucht-Kost. Durchgestandene Tiere mit geprüftem Gewicht.

Vorzeichen des oft sehr unvermittelt einsetzenden Todes an. Die Vorfütterung wird gut und auch entsprechend lang vertragen, nur die Injektionsbehandlung bringt viel Komplikationen, schon bald nach den ersten Injektionen stirbt eine größere Zahl. Die Entwicklung der Abszesse ist, verglichen mit anderen Futterarten, gering, die Eiterbildung nicht sehr stark, doch kommt die Rückenhaut über dem Abszeßgebiet eher zur Nekrose als sonst.

Der Körperbefund beim Tode steht im Zeichen der stärksten Atrophie. Dem hohen Gewichtsverlust entspricht der vollkommene Mangel allen Fettgewebes, die Organe selbst, besonders Milz und Leber, sind ganz außerordentlich klein geworden. Die *Leber* von dunkelbrauner Farbe, die *Milz*, ebenfalls viel dunkler als sonst, ist bis auf Bruchteile ihrer Normalgröße atrophiert und das von dem allgemeinen Schwund am meisten betroffene Organ, die Nebennieren, haben den

Lipoidgehalt ihrer Rinde eingebüßt. Auf der Oberfläche der *Niere* sind kleine narbige Schrumpfungsherde nicht selten.

Der *mikroskopische Befund* entspricht dem makroskopischen. Konform mit dem Zellschwund erscheint das Trabekelsystem der Milz relativ sehr vermehrt; der Zelluntergang betrifft in allererster Linie die Pulpa, die Follikel rücken immer näher aneinander, in den perifollikulären Zonen ist der Zellschwund besonders stark und mit dem Untergang der lympho-leukozytären, kommt es zum Auftreten histiozytärer Zellen, welche infolge ihrer Fähigkeit zur Faserbildung zu einer Art von Fibroadenie führen. An der *Leber* fällt die sehr geringe Weite aller Kapillaren auf. Leberzellen und die Leberzellkerne sind verkleinert; doch ist auch noch eine Anzahl von großen, übergroßen und auch Doppelkernen vorhanden. Dazwischen treten allenthalben kleine dunkle, etwa lymphozytengroße Zellkerne in Erscheinung, die zu zugrunde gehenden Leberzellen gehören. In den Kupfferschen Sternzellen tritt ein sehr feinkörniges, in einzelnen Körnchen sehr distinktes, schwarzbraunes Pigment auf mit manchmal angedeuteter Scharlachrotfärbung, Eisenreaktion negativ. In einigen Fällen (vorwiegend den amyloidpositiven) kommt es zu kleinen periportalen Zellinfiltraten aus Histiozyten und Leukozyten, deren Bedeutung noch zu würdigen sein wird. Der Fettgehalt der Leberzellen ist sehr großem Wechsel unterworfen; aber in den meisten Fällen sind sie fettfrei. Es erscheint nur in feinkörniger Form in den peripheren Abschnitten der Läppchen, regelmäßig ohne Doppelbrechung.

Die *Nebennieren* erleiden einen erheblichen Lipoidschwund, bei dem die scharlachrot färbbaren Fette weniger betroffen sind als die doppelbrechenden Cholesterine, von denen in der Nebennierenrinde oft keinerlei Spuren mehr auffindbar sind, obwohl in den Rindenzellen noch scharlachrot-färbbares Fett vorhanden ist. Demgegenüber enthält in den gleichen Fällen das Fettgewebe um Niere und Nebenniere herum noch sehr reichliche doppelbrechende Fette im Neutralfett der Fettgewebszellen.

Die narbigen Einziehungen der Nierenoberfläche sind schmale kleine Rindenbezirke, in denen die Tubuli zugrunde gegangen sind und der Gewebsschwund durch eine lympho-histiozytäre und Bindegewebswucherung unter Einziehung der Rinde ersetzt ist. In den Tubuli contorti entdeckt man dabei gelegentlich im Lumen wie in den Epithelien kleine, etwa zellkerngroße kugelig-vakuoläre Gebilde der Klosiella muris, eines Parasiten, als dessen Auswirkungen der Untergang der Tubuli und die reaktiven Zellwucherungen angesehen werden. Er soll 40% aller Mäuse befallen (Th. Smith, Sternberg). Es ist aber festzustellen, daß er bei weitem nicht in einem so hohen Prozentsatz derartige Narbenbildungen an den Nieren setzt und man wird annehmen müssen, daß solche atrophisch-narbenbildende Prozesse auch aus anderen Ursachen auftreten können.

Das Ergebnis des Amyloidversuches war entgegen aller Erwartung überraschend, insofern als die Amyloidrate nicht stieg, sondern sank. Damit erheben sich nun 2 Fragen: Erstens, ist die Senkung der amyloidpositiven Fälle in der Tat einer „Besserung der Antikörperbildungsfähigkeit" zuzuschreiben, eine nahezu paradox anmutende Annahme, und zweitens, darf man die fortschreitende Atrophie sowie die Änderung der Amyloidquote auf den Mangel an Vitamin A zurückführen?

Wenn man die zweite Frage zuerst beantwortet, so müssen die im Laufe des letzten Jahrzentes von Kollath mitgeteilten Ergebnisse Berücksichtigung finden.

Im Laufe dieser Versuche, die sich hauptsächlich auf die Frage der Wirkungsweise der Vitamine erstreckten und in neuartiger Weise Wachstum und Zellersatz als Indikatoren für die Beurteilung der Vitaminwirkung benutzten, ergab sich die von KOLLATH neu begründete Ansicht, daß für die Entstehung der sog. Avitaminosen noch andere Dinge eine Rolle spielen, als nur die einfache Abwesenheit eines bestimmten Vitamins. Nach KOLLATHS Ansicht kommt den sog. „Wuchsstoffen" eine entscheidende Rolle zu. KOLLATH findet diese hypothetischen Wuchsstoffe in der Hefe und in Getreidekeimen vorhanden. Ihre chemische Natur ist nicht erfaßt, und es wird sich meines Erachtens fragen, ob diese hypothetischen Stoffe nicht doch schon Vitamine von den uns bekannten Arten sind. Denn letzten Endes ist bei noch wachsenden Tieren jedes Vitamin in gewisser Hinsicht ein „Wuchsstoff", dessen Fehlen eben im Stillstand des Wachstums sich erweist.

War dies für die Rhachitis und das Vitamin D schon stets eine nicht bestrittene Tatsache, denn die Rhachitis ist eben die Krankheit des wachsenden Knochens, so ist auch die Wirksamkeit des Vitamin A als Karotin nach KOLLATH an die Anwesenheit eines anderen — in Hefe und Getreidekeimen vorhandenen — Stoffes gebunden, der die eigentliche Anregung zum Wachstum geben muß. Es ist aber wichtig, daß er „Wachstum" nicht allein durch Gewichtszunahme feststellt, sondern die histologische Untersuchung der Knorpel-Knochengrenze als objektive Unterlage für die Erfassung der Wachstumsvorgänge benutzt und nach Abschluß des eigentlichen Wachstums die Neubildung von Zellen als Ersatz für untüchtig gewordene in der Beurteilung dem Wachstum gleichgesetzt. Dabei wäre es aber wünschenswert gewesen, zwischen Wachstum und Differenzierung von vorneherein klarer zu unterscheiden.

Unsere eigenen Versuche gewinnen zu einer letzten Feststellung noch besondere Beziehungen. KOLLATH fand an Ratten, daß dieselben mit einer Kost aus Kasein, Stärke, Talg, einem Zusatz von Kaliumphosphat und Vitamin B_1 ohne alle weiteren Vitamine und Mineralien trotzdem bis zu 2 Jahren zu leben vermögen; Gewichtszunahme und Wachstumszeichen an den Knorpelknochengrenzen fehlen gänzlich. Die Organe zeigen Kalkablagerungen in der Herzmuskulatur und in den Nieren als Merkmale eines gestörten Kalkstoffwechsels, es kommt zu ähnlichen Narbenbildungen im interstitiellen Bindegewebe der Nieren wie bei unseren Tieren, in der Lunge zu Emphysem usw. KOLLATH gibt allerdings den als *Mesotrophie* benannten Befunden eine Deutung, welcher ich nicht zu folgen vermag.

Was die Beurteilung dieser Mesotrophie betrifft, so ist zu den dabei festgestellten „Altersveränderungen" und dem „verfrühten Altern" einiges Einschränkende zu sagen. Wenn man an einer Ratte im Alter von etwa 30 Wochen infolge Mangelernährung das Wachstum an den Knorpelknochengrenzen eingestellt findet, so ist von vornherein nicht zu erwarten, daß bei Rückkehr zur Vollkost ein erneutes Längenwachstum der Knochen eintritt. Eine zum Abschluß gekommene Epiphysenlinie wird niemals wieder zu neuem Wachstum übergehen können, eine Erfahrung, die aus der menschlichen Pathologie genügend bekannt ist; ich erinnere außerdem an den durch Vitamin-D-Überdosierung bewirkten endgültigen und prämaturen Wachstumsstillstand infolge Abschlusses der Epiphysenlinien bei Ratten und den damit erzeugten Zwergwuchs. Wenn nach KOLLATH ein Rattenjahr gleich 26 Menschenjahren sein soll (bei einer Lebensdauer der Ratte von 4 Jahren würde ich ein Rattenjahr allerdings lieber mit etwa 15 Jahren veranschlagen), so läge eine 30 Wochen alte Ratte an sich schon außerhalb der Zeit des Längenwachstums; man kann also aus all diesen Gesichtspunkten heraus nicht von einer Unmöglichkeit der Heilung sprechen, wenn es nicht gelingt, das Längenwachstum bei den Tieren dieses Versuches wieder in Gang zu bringen.

Die sog. „Altersveränderungen", welche KOLLATH in erster Linie auf Grund der Verkalkungen anzunehmen geneigt ist, haben mit vorzeitigem Altern nichts zu tun. Wenn Verkalkungsprozesse und Alter überhaupt eine Beziehung haben, so handelt es sich stets um die dem Pathologen gut bekannte dystrophische Verkalkung; was KOLLATH beschreibt, ist ein Schulbeispiel einer Kalkmetastase, die als Zeichen des Knochenabbaues infolge nutritiven Kalkmangels (s. Diätvorschrift) anzusehen ist. Gleiches trifft für die Schrumpfungsherde in den Nieren zu; auch hier liegen dystrophische Vorgänge an den Zellen der Nierentubuli vor, als deren Folge eine vikariierende Wucherung des interstitiellen Bindegewebes der Niere einsetzt; also auch hier besteht a priori keinerlei Beziehung zu dem Begriff Alter.

Das sog. vorzeitige Altern, die Alterskrankheit und die Auslegung der Experimentalbefunde in dieser Richtung, insbesondere die daraus gezogenen weitreichenden Schlüsse, beruhen auf einer Fehldeutung pathologisch-physiologischer Vorgänge bzw. deren morphologischer Folgen.

Aber dennoch bestehen zwischen unseren Befunden an den Mäusen und den KOLLATHschen Ergebnissen an Ratten hinsichtlich der starken Atrophie und der Nierenbefunde Beziehungen, welche daran denken lassen, daß dieser als Mesotrophie bezeichnete Zustand auch in unseren Versuchen vorliegt. Zwar sind mehr und andere Salze als nur Kaliumphosphat in unserer Kostmischung enthalten, aber im grundsätzlichen gleicht unsere Kaseinstärkekost mit dem Hefe- und Salzzusatz der mesotrophen Diät KOLLATHs. Ich kann im Augenblick mit diesen Versuchen allein noch nicht entscheiden, ob nicht neben der Mesotrophie auch eine reine Hungeratrophie Grund genug für den starken Marasmus war, da ja, wie erst viel später gefunden wurde, ein großer Teil der Stärke nicht als Energiequelle ausgenutzt werden konnte; aber der Eiweißgehalt des Futters war sehr hoch, und so müßte er eigentlich den einfachen Kalorienverlust wieder ausgleichen. Handelt es sich aber um Mesotrophie, so kann nach KOLLATHs Feststellungen das Vitamin A als fettlösliches Vitamin gar nicht zur Wirkung kommen, und die Folgeerscheinungen solcher Fütterung, d. h. die hochgradige Atrophie und die Herabsetzung der Amyloidrate wären dann nur mittelbare und keine unmittelbaren Folgen des Vitamin-A-Entzuges.

Wenn der mangelhafte oder fehlende Zellersatz nach KOLLATH zu den markantesten Merkmalen der Mesotrophie gehört, so lassen sich unter diesem Gesichtspunkt noch 2 andere Beobachtungen aus diesem Experiment wohl verstehen. Die Eiterungen als Folge der subkutanen Injektionen von Nuklein-Natronlauge waren bei dieser Versuchsart besonders gering; der Gewebsschaden bleibt der gleiche, die Eiterbildung, mit anderen Worten die Bildung und Exsudation von Leukozyten aber sinkt ab, weil der „Zellersatz" durch die Mangelernährung Not leidet. Gleiches könnte gelten für die schneller einsetzende Nekrose der Rückenhaut über der Injektionsstelle und ganz besonders für den starken Gewichtssturz, wobei die durch die parenteralen Eiweiß-

injektionen bewirkte Einschmelzung von Körpersubstanz nicht mehr durch Neuansatz ausgeglichen werden kann.

In weiteren Versuchen nimmt Kollath zu der Frage der Antikörperbildung Stellung und findet, daß bei mesotropher Kost, d. h. also dem Mangel aller Vitamine bis auf B_1, die Lysinbildung erhalten, die Agglutininbildung aber unterbrochen ist. Über Präzipitinbildung liegen keine Befunde vor. Verschiedene Arten von Antikörpern zeigen unter gleichen Mangelverhältnissen der Ernährung also ein dissoziierendes Verhalten.

Was unseren Spezialfall und die Frage betrifft, ob die Präzipitinbildung durch die Vitamin-A-freie Mangelernährung in anscheinend paradoxer Weise verbessert würde, so gehört zur Amyloidentstehung eine zwar verschlechterte und herabgesetzte, aber doch immer noch vorhandene Antikörperbildung. Entsteht aber überhaupt kein Amyloid mehr, so dürfte dies dafür sprechen, daß auch keine Antikörper mehr gebildet worden sind und deshalb das Amyloid ausbleibt. Wir hätten also hier als Erfolg der Vitamin-A-freien Fütterung anzusehen, daß die Antikörperbildung nicht etwa, wie es zunächst den Anschein hätte haben können, verbessert, sondern so stark verschlechtert wurde, daß eine Amyloidbildung überhaupt nicht mehr möglich war, und daß das Absinken der Amyloidrate sich aus diesem Umstande erklärt.

Ist dies aber nun eine Wirkung des totalen Defizits an Vitamin A oder anderer Faktoren? Die schon oben einmal in Beziehung zu den Kollathschen Versuchen angeschnittene Frage war vielleicht nur dadurch zu klären, daß man das verwandte Futter durch eine entsprechende Menge Vogan zu komplettieren versuchte.

Ich habe nun noch einen Versuch durchgeführt, bei welchem während des Amyloidexperimentes Vogan mit der Vitamin-A-freien Kost zugefüttert wurde. Sollte das Vitamin A die Präzipitinbildung nur relativ verbessern, so mußte bei dieser Art des Experimentes dann wieder eine Erhöhung der Amyloidquote eintreten. Dieser „Komplettierungsversuch" wurde mit einigen Variationen in der Vorfütterung an insgesamt 88 Tieren vorgenommen. 25 Tiere verstarben in der Vorfütterung *vor* Beginn der Injektionsbehandlung.

Die Vorfütterung geschah meist mit AZK für etwa 14 Tage, nachdem die Tiere zuvor mit Normalfutter aufgezogen waren. Nach 2 Wochen AZK Beginn der Vitamin-A-freien Fütterung für durchschnittlich 3 Wochen; dann beginnt die Komplettierung des Vitamin-A-freien Futters mit Vogan in Höhe von täglich 1000, in der letzten Versuchswoche 2000 RE; diese werden für je 2 Tage zusammen in der Pipette (0,1 cm^3) verabreicht. 2 Tage nach Beginn der Voganfütterung beginnt der Injektionsversuch in der üblichen Weise (Tabelle 3).

Von den 63 Tieren überstehen den Versuch nur 26; ein sehr schlechtes Ergebnis im Hinblick auf eine erfolgreiche Komplettierung des Vitamin-A-freien Futters mit Vogan; denn der völlig Vitamin-A-freie Versuch hatte 84 Tiere, von denen 15 in der Vorfütterung starben und 36 von 69 den ganzen Versuch überstanden. Das sind 52,2% gegenüber 41,3% ($\pm$ 6,2) bei der Zufütterung von Vitamin A in reiner Form zu dem Vitamin-A-freien Futter.

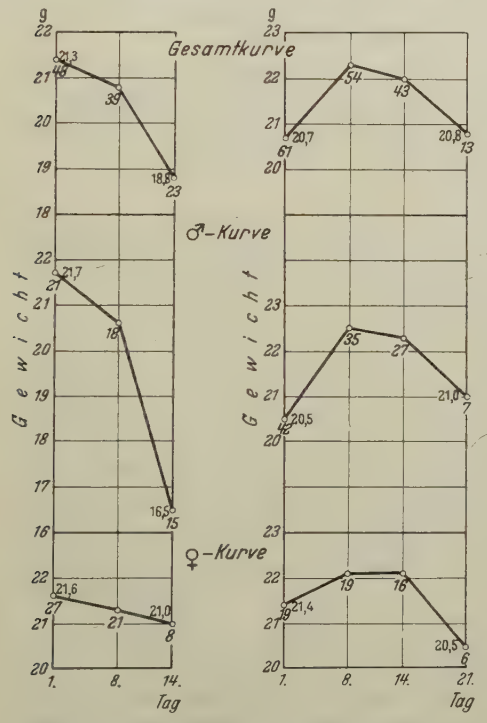
Tabelle 3. *Vogan-Komplettierungsversuch.*

Zahl der Tiere ♂ ♀	Überstanden ♂ ♀	+ ♂ ♀	% ♂ ♀	Mittlere Abweichung ♂ ♀	Organbeteiligung	q	Amyloidstärke in Milz	s
63	26	4	15,4	$\pm 7{,}08$	Milz 4	200	+++ = 2	100
					Leber 3		++ = 2	
42 21	13 13	1 3	7,7 23,1	$\pm 7{,}39$ $\pm 13{,}66$	Nieren 1		+ = 0	
							(+) = 0	

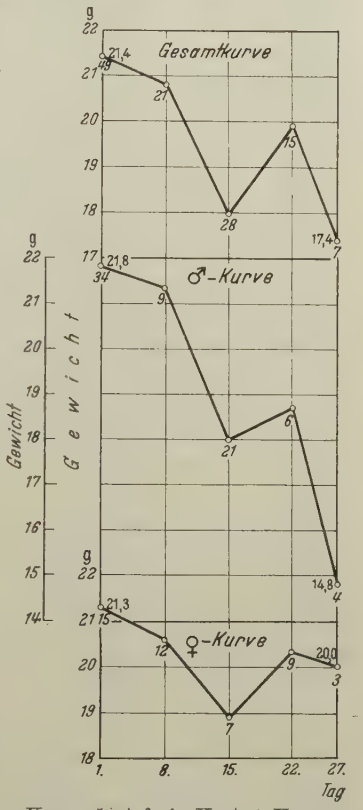
Man wird aus diesem Ergebnis schließen müssen, daß die Gegenwart von Vitamin A für die Lebensdauer der Tiere und ihre Resistenz gegenüber dem Eingriff des Versuches *keine* Bedeutung besitzt. Im Vitamin-A-freien Experiment erkrankten von 36 Tieren 4 an Amyloid, im Komplettierungsversuch von 26 ebenfalls 4, also 11,1% ($\pm$ 5,2) gegenüber 17,6% ($\pm$ 9,3). Wenn man den Fehler der kleinen Zahl berücksichtigt, so besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Wirkungsprozentsätzen. In der Resistenz sind sich Weibchen und Männchen völlig gleich; in der Amyloiderkrankung überwiegen die Weibchen die Männchen; im Vitamin-A-freien Versuch aber die Männchen die Weibchen. Die Dinge liegen hier in der Umkehr des Geschlechtsverhältnisses ähnlich wie bei Voganfütterung mit AZK; dort ist ohne Vogan ein Überwiegen der Männchen, mit Vogan ein solches der Weibchen gefunden worden. Der Organausbreitungsfaktor und Stärkegradfaktor sind beide höher als in anderen Versuchen, das Einzeltier erkrankt also wie im Vitamin-A-freien Versuch stärker. Wir haben daher festzustellen, daß die Zugabe von Vogan zu Vitamin-A-freiem Futter als Komplettierung weder die Resistenz im Versuch noch die Amyloidrate mit Sicherheit verbessert.

Die bei der Konzeption dieses Experimentes ausgesprochene Erwartung einer Erhöhung der Amyloidrate ist also nicht in befriedigender Weise erfüllt. Nach den KOLLATHschen Anschauungen kommt Vitamin A in einer fettfreien Futtermischung überhaupt nicht richtig zur Wirkung, und unser Resultat spricht eigentlich ganz in diesem Sinne. Es darf auch nicht vergessen werden, daß das Vitamin-A-freie Futter mit seinem nur schlecht verdaubaren Stärkegehalt zu einer gewissen Inanitionsatrophie führt und somit unspezifischer Grund für das Resultat sein könnte; aber, wie schon gesagt, sollte der ziemlich hohe Proteingehalt von 47% den Mangel weitgehend kalorisch äquilibrieren. Das geht auch besonders aus dem Lauf der Gewichtskurven hervor, welche in allen Fällen angelegt wurden; dabei zeigt sich die auffällige Beobachtung, daß die Tiere bei AZK-Fütterung entweder im Gewicht stehenbleiben oder abnehmen, um bei Überleitung zur Vitamin-A-freien Kost mit Regelmäßigkeit wieder anzusteigen, oft über das Anfangsgewicht hinaus. Erst mit Einsetzen der Injektionsbehandlung,

insbesondere bei täglichen Injektionen, haben sie eine ziemlich stark abfallende Kurve (Kurve 4). Der Gewichtssturz wird also erst durch die Injektionsbehandlung verbunden mit der Fütterung bewirkt. Diese Erscheinung kann auch durch zusätzliche Vogangabe nicht verhindert werden (Kurve 5). Man muß also sagen, daß neben dem Vitamin-A-Entzug in diesem Versuch auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen für das auffällige Schwinden der amyloidpositiven



Kurve 4. A-Zucht-Kost. A-freie Kost.



Kurve 5. A-freie Kost + Vogan.

Erläuterungen zur Kurvendarstellung 4 und 5. 2 mm entsprechen jeweils horizontal 1 Tag. 1 mm entspricht vertikal 1 g Gewicht. Anfang und Ende der Kurve tragen Gewichtsangaben; außerdem sind Wochen markiert und die Zahl der Tiere, aus denen jeweils die Durchschnittsziffer gewonnen wurde, also 1. Tag 48 Tiere 21,8 g. Kurve 4 zeigt zunächst Fütterung mit AZK für 3 Wochen, dann Übergang zu Vitamin-A-freier Kost für weitere 3 Wochen. Kurve 5 gibt den Verlauf für die dann einsetzende Injektionsbehandlung zugleich mit Vogankomplettierung; trotzdem starker Gewichtssturz.

Tiere, womit wir wieder auf die schon eingehend besprochenen Versuche von Kollath mit seiner mesotrophischen Kost zurückgeführt werden.

Als Unterschied zu den Vitamin-A-freien Versuchen ohne Vogankomplettierung kann noch bemerkt werden, daß die Tiere durchweg eine stärkere Eiterung zeigten als die Versuche ohne Vogan, also anscheinend durch dieses doch eine

verbesserte Leukozytenbildung eintrat. Die Rinde der Nebenniere enthält bei den mit Vogan „komplettierten" Tieren eine sehr dichte und breite scharlachrote Fettzone, oft stärker als die normale Rinde, wobei auch die Doppelbrechung als Zeichen der Cholesterinesterspeicherung reichlich und stärker als normal auftritt. Im Falle der Amyloiderkrankung ist der Fett- und Cholesterinestergehalt in Leber bzw. Nebenniere regelmäßig herabgesetzt. In der Leber kommen häufig Zellproliferationsherde in der Glissonschen Kapsel zur Erscheinung, ein Befund, der bei vollatrophischen Tieren gänzlich fehlt und mit dessen Bedeutung in Beziehung zur Amyloidose wir uns, wie schon gesagt, später noch einmal zu befassen haben werden. Vorwegnehmend sei bemerkt, daß ich diese Herde als morphologisches Merkmal der wiederkehrenden oder überhaupt vorhandenen mesenchymalen Reaktionsfähigkeit des Organismus auffasse.

Als Endergebnis der Versuche stellt man also fest, daß bei Vitamin-A-freier Fütterung die Amyloidrate wesentlich sinkt, also wiederum eine Abhängigkeit der amyloidkrankmachenden Behandlung von der Art der Fütterung festzustellen ist, daß aber dem Vitamin A eine spezifische Rolle bei diesen Verhältnissen *nicht* zukommt.

Um zum Abschluß dieser Fragen zu kommen, wurde noch ein Versuch angestellt, der einen unmittelbaren Einfluß des Vitamin A auf die Bildung präzipitierender Antikörper zu demonstrieren in der Lage sein müßte. Naturgemäß ließ sich eine solche Frage nur an einem größeren Tier und einem bekannt guten Präzipitinbildner befriedigend bearbeiten. Aus diesem Grunde wurde das Kaninchen gewählt. Da der Entzug von Vitamin A aus dem Futter sich nicht ohne tiefgreifende Änderungen anderer Art an diesem durchführen läßt und somit wiederum nicht eindeutig in einer Richtung verläuft, so wurde auf den „Entzugsversuch" verzichtet und nur der „Komplettierungsversuch" angestellt, d. h. zu einem gewöhnlichen Futter wurden den Tieren tägliche Voganmengen gereicht und unter diesen die Bildung von Präzipitinen gegen Rinderserum geprüft.

Die ersten Versuche dieser Art wurden von Pfannenstiel 1928 und später von seinem Schüler Jusatz ausgeführt. Pfannenstiel untersuchte in erster Linie die Bakterizidie des Blutes bei verschiedener Fütterung und stellte fest, daß dieselbe bei Haferfütterung schlecht, bei Kartoffelfütterung gering, bei Grünfutter aber besser war. Nach seiner Meinung sind Verschiebungen im Lipoid- und Mineralstoffwechsel als hiefür maßgebende Gründe wichtig. Nach den Untersuchungen von Jusatz gelingt es durch langdauernde einseitige vitaminarme Fütterung die Bakterizidie sowohl wie die Antikörperbildung des Blutes herabzusetzen. Gibt man zu dieser Mangelkostfütterung Vitamin A, so erfolgt *keine* Verbesserung des Präzipitintiters, was aber, wie gesagt, noch nicht eindeutig ist, da es diesem Futter an noch mehr mangelt als an Vitamin A. Demgegenüber gelingt es mit 100 mg Askorbinsäure, intravenös verabfolgt, den Präzipitintiter wesentlich zu erhöhen und mit hohen Dosen Vitamin D denselben herabzudrücken. B-Vitamin bleibt unwirksam.

Unsere Kaninchen wurden wie gewöhnlich im Sommer mit Grünfutter, im Winter mit Rüben und Heu gefüttert und in gewissen Abständen, insbesondere im Winter, Mais- oder Haferkörner zugegeben. Zu dieser Kost wurden verschieden hohe Dosen von *Vogan täglich* verabreicht, und zwar in öliger Form auf kleine

Stückchen Brot aufgetropft, eine Art der Darreichung, die die Tiere sehr gerne annahmen und stets vor der täglichen Fütterung erhielten. Immunisierung: Innerhalb von 10 Tagen und im Abstande von 2—3 Tagen fallende Mengen von Rinderserum 4, 3, 2 und 1 cm^3 intravenös. Eine Woche vor Beginn der Immunisierung setzt die Voganfütterung ein. Dabei muß bei der Tierauswahl ein Umstand gewürdigt werden, der mir bisher nicht genügend beachtet zu sein scheint. Selbst unter gleichen Rassen ist die Präzipitinbildung bei gleichbleibender Fütterung und gleicher Immunisierung nach meinen Erfahrungen nicht gleich hoch. Ich habe festgestellt, daß sich nur Tiere eines Wurfes miteinander vergleichen lassen, wobei eine Familie eine gute, eine andere eine schlechte Präzipitinbildung zeigen kann: die einzelnen *Tiere eines Wurfes sind* aber in ihren Reaktionen ziemlich *gleich*. Die Versuche liefen mit denselben Tieren auf rund 2 Jahre, innerhalb der einzelnen Geschwisterreihen wurden die Kontrolltiere nach der ersten Versuchsphase getauscht und als Hauptversuchstiere und umgekehrt eingesetzt. In der ersten Versuchsphase wurde auch jeweils das Blutcholesterin untersucht.

Auf die Darstellung von Einzelwerten wird aus Raumgründen verzichtet.

Die über die Dauer von 2 Jahren fortgeführten Untersuchungen ergaben für das Kaninchen, daß durch Zufütterung von Vogan die Präzipitinbildung, gemessen am Uhlenhuttiter, nicht verbessert werden kann und bestätigen damit den „Entzugsversuch" von Jusatz, in welchem Vitamin-A-freies Futter die Präzipitinbildung nicht beeinflußte.

In früheren Arbeiten von Wendt wurde bei Fütterung von Vogan eine Erhöhung des Cholesteringehaltes des Blutes gefunden. Wendt hat allerdings wesentlich höhere Mengen Vogan verfüttert, welche zweifellos als unphysiologisch angesehen werden müssen. Die von uns verabreichten Mengen stehen im Bereiche der natürlicherweise in der Nahrung vorhandenen Mengen. Die Normalwerte für Gesamtcholesterin liegen bei 12 Bestimmungen von 3 Tieren zwischen 41 und 73 mg-%, das freie Cholesterin, das durchschnittlich die Hälfte des Gesamtgehaltes beträgt, liegt bei 18 mg-% bis 33 mg-%.

Die Voganfütterung hebt nun das Blutcholesterin, einmal nur wenig und nicht über die auch im Kontrollfall gesehenen Schwankungen von 20 mg-%, bei den 10 Tropfentieren aber in jedem Fall um das Doppelte des Ausgangswertes.

Während der Präzipitintiter nun weiter steigt, wird der anfängliche Cholesterinanstieg aber gefolgt von einem sehr erheblichen Abfall unter den ersten Ausgangswert, und zwar bei allen Tieren. Die Vogandarreichung hat also keinen Zusammenhang mit dieser Bewegung des Blutcholesterins; es kann sich hier nur um eine Folge der Immunisierungsvorgänge handeln. Das freie Cholesterin macht die geschilderten Bewegungen des Gesamtcholesterins mit, sinkt aber während der Immunisierungsphase häufig auf ein Drittel ab, d. h. die Ester vermehren sich.

Fassen wir die *Ergebnisse dieses zweiten Teiles zusammen*, so kommen wir zu folgenden Feststellungen:

1. Der Entzug von Vitamin A aus der Nahrung führt zur Herabsetzung der Erkrankungsziffer bei Erzeugung der experimentellen Amyloidose.

2. Die Zugabe von Vogan zu Vitamin-A-freiem Futter bleibt ohne Wirkung auf die Erfolgsziffer des Amyloidexperimentes; eine Erhöhung der Erkrankungszahl tritt damit *nicht* wieder ein.

3. Vitamin A ist also für die Vorgänge, welche zur Amyloidentstehung führen, belanglos.

4. Durch Zuführung von Vitamin A zur täglichen Nahrung kann bei Kaninchen der Präzipitintiter gegen artfremdes Serum *nicht* erhöht werden.

Literatur.

Bieling: Dtsch. med. Wschr. **1927**, 182, 228. — Bomskov: Methodik der Vitaminforschung. Leipzig: Georg Thieme 1935. — Domagk: Virchows Arch. **290**, 385 (1933). — Glanzmann: Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung, Bd. 1. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1938. — Helmen u. Jansen: Stud. Inst. Divi Thomae **1**, 10 (1937). — Nach Stepp-Schroeder-Kühnau. Die Vitamine. Stuttgart: Ferdinand Enke 1944. — Jakobj: Roux' Arch. **141**. H. 3 (1942). — Jusatz: Z. exper. Med. **87**, 529 (1933). — Dtsch. med. Wschr. **1934**, 15, 573. — Klin. Wschr. **1934**, 95. — Z. Vitaminforsch. **3**, 268 (1934). — Z. Immunit.-forsch. **88**, 472, 483 (1936). — Kollath: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, (1941); **199** (1942). — Z. inn. Med. **1**, H. 1/2 (1946); **2**, H. 1/2 (1947). — Laubmann: Klin. Wschr. **1933**, 1171. — Letterer: (1) Beitr. path. Anat. **75** (1926). (2) Virchows Arch. **293**, 34 (1934). — (3) Virchows Arch. **317** (1948). - McCluny and Winters: J. infect. Dis. (Am.) **51**, 469 (1932). — Moll, Domagk u. Lagner: Klin. Wschr. **1933**, 465. — Noetzel: Z. exper. Med. **105**, 83 (1939). — Oelrichs: Z. Hyg. usw. **117**, 684 (1936). — Pfannenstiel u. Jusatz: Z. Immunit.forsch. **56**, 389 (1928). — Pfannenstiel u. Scharlau: Z. exper. Med. **71**, 465 (1930). — Schmidt, M. B.: Störungen des Eisenstoffwechsels und ihre Folgen. Erg. Path. **35**, 105 (1940). — Sherman: Siehe Bomskov. — Smith, Tn.: Bei Pfeiffer. Protozoen als Krankheitserreger. Jena 1890. — Sternberg: Wien. klin. Wschr. **1929**, 419. — Strauss: Beitr. path. Anat. **94**, 345 (1934). — Thoenes: Jkurse ärztl. Fortbild. **28** (1937). — Wendt: Dtsch. med. Wschr. **1937**, Nr 30. - Werkman: J. infect. Dis. (Am.) **32**, 247 (1923).

Prof. Dr. E. Letterer, (14b) Tübingen, Patholog. Institut der Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 525—539 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobinen.

IV. Mitteilung*.

Kristalliner $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester.

Von

Jens Alslev und Manfred Kiese.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. April 1949.)

Aus dem $Verd_{NO_2}$, der prosthetischen Gruppe des $Verdoglobin_{NO_2}$[1], wurde in einer früheren Untersuchung[2] ein Porphyrindimethylester erhalten, der sich durch seine Säurelöslichkeit, Lichtabsorption und einige Reaktionen dem Spirographisporphyrindimethylester als sehr ähnlich erwies. Eine Reinigung des Porphyrinesters bis zur Kristallisation konnte seinerzeit nicht durchgeführt werden. Wir haben jetzt den Ester kristallin erhalten.

Es wurde zunächst versucht, aus größeren Ansätzen der früher beschriebenen Art[2] den Ester zur Kristallisation zu bringen. Nach Enteisenung des $Verd_{NO_2}$ und gleichzeitiger Veresterung in Methanol, das mit Chlorwasserstoff gesättigt war, wurde der Farbstoff in Äther überführt und durch fraktionierte Extraktion eine Trennung von dem Protoporphyrindimethylester und geringen Mengen anderer Farbstoffe erreicht. Der $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester wurde wieder in Äther getrieben, der Äther im Vakuum verjagt und der Ester in Chloroform aufgenommen. Nach Einengen des Chloroforms und Zugabe von Äther sollte der Ester zur Kristallisation gebracht werden. Es fiel dabei zwar ein grüner Farbstoff aus, der jedoch auch nach wiederholtem Ausfällen aus Chloroform mit Äther nicht kristallisierte.

Erfolgreich erwies sich dagegen eine Trennung der Enteisenung und Veresterung. Mit konzentrierter Ameisensäure und Ferrum reductum wurde das Eisen aus dem $Verd_{NO_2}$ und beigemischtem Häm entfernt. Das Porphyringemisch wurde dann mit Methanol-HCl verestert und aus Äther mit Salzsäure fraktioniert. Schließlich wurden dann aus Chloroform-Azeton einheitliche Kristalle mit konstantem Schmelzpunkt erhalten.

Fischer und Deilmann[3] konnten durch Chromatographie eine Trennung von Spirographisporphyrinester und Protoporphyrinester

* III. Mitteilung: Arch. exper. Path. **205**, 747 (1948).

[1] Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 385 (1947).

[2] Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 439 (1947).

[3] Fischer, H., u. K. O. Deilmann: Z. physiol. Chem. **280**, 186 (1944).

durchführen. Da wir zunächst eine Identität des Verd$_{NO_2}$- und des Spirographisporphyrindimethylesters annahmen, versuchten wir ebenfalls, durch Chromatographie den Proto- von dem Verd$_{NO_2}$-porphyrinester zu trennen. Das Estergemisch wurde in Äther oder Chloroform auf eine mit Äther oder Chloroform eingeschlemmte Aluminiumoxydsäule gegeben und mit Äther oder Chloroform nachgewaschen. Die weitaus größte Menge des Farbstoffgemisches wanderte einheitlich ohne Schichtenbildung durch die Säule. Spektroskopisch waren beide Ester etwa in dem ursprünglichen Verhältnis in der Lösung nachweisbar. In der obersten Schichte der Säule wurde ein braunroter Farbstoff adsorbiert, der mit Äther gar nicht, mit Chloroform nur sehr gering, dagegen sehr gut mit Methanol aus der Säule zu eluieren war. Spektroskopisch lag in dem Methanol ebenfalls ein Gemisch von Proto- und Verd$_{NO_2}$-porphyrin vor. Wurde dieses Gemisch erneut mit Methanol-Salzsäure verestert, in Äther übergeführt und chromatographiert, so ging diesmal die Hauptmenge der Farbstoffe gleichmäßig durch die Säule. Es scheint deshalb der Schluß gerechtfertigt, daß es sich bei dem bei der ersten Chromatographie in der obersten Schicht adsorbierten Farbstoffgemisch um geringe Mengen unveresterten Porphyrins gehandelt hat. Zur Reinigung des Verd$_{NO_2}$-porphyrinesters wurde deshalb die Chromatographie zweimal in den präparativen Arbeitsgang eingeschaltet.

Abb. 1. Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylester aus Chloroform-Azeton. Vergr. 1:480.

Da sich der Verd$_{NO_2}$-porphyrinester chromatographisch anders verhielt als der Spirographisporphyrinester, schien uns eine Identität der beiden schon danach nicht mehr sehr wahrscheinlich zu sein. Eine Entscheidung konnte durch die Kristallform und den Schmelzpunkt des Verd$_{NO_2}$-porphyrinesters getroffen werden. Der Spirographisporphyrinester von FISCHER und DEILMANN und auch der analytische Spirographisporphyrinester von WARBURG und NEGELEIN[4] kristallisierte in

[4] WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Biochem. Z. **244**, 239 (1932).

gleichmäßigen, schräg abgeschnittenen Prismen mit einem Schmelzpunkt von 282—283° bzw. 280—281° (KOFLER). Der $Verd_{NO_2}$-porphyrinester kristallisierte aus Chloroform-Azeton in gleichmäßigen rhombischen Kristallen, wobei der stumpfe Winkel des Rhombus abgerundet war und der spitze Winkel nochmal schräg abgeschnitten erschien (Abb. 1). Aus Chloroformäther kristallisierte der Ester in lanzettförmigen Kristallen (Abb. 2). Bei beiden Kristallformen lag der Schmelzpunkt konstant bei 269° (KOFLER) und änderte sich auch nach mehrmaliger Umkristallisation nicht. — Das Röntgendiagramm des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters, dessen genaue Auswertung bei der Beschreibung der Versuche folgt, kann mit dem Röntgendiagramm des Spirographisporphyrindimethylesters nicht verglichen werden, da FISCHER und DEILMANN außer einer verkleinerten Abbildung des Röntgendiagramms keine weiteren Daten mitgeteilt haben.

Abb. 2. $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester aus Chloroform-Äther. Vergr. 1:480.

Das quantitative Absorptionsspektrum der Lösung des kristallinen $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters zeigte hinsichtlich der Maxima seiner Banden noch größere Übereinstimmung mit dem Spektrum des Spirographisporphyrinesters als das frühere Spektrum der lediglich durch Salzsäure-Ätherfraktionierung gewonnenen Esterlösung (Tabelle 1). Ebenso wie der Spirographisporphyrinester zeigte das Spektrum des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters Rhodotyp mit intensivster dritter Bande, die Reihentolge

Tabelle 1. *Extinktionsmaxima des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters und des Spirographisporphyrindimethylesters in mμ.*

$Verd_{NO}$-porphyrindimethylester, Kristalle gelöst in Chloroform. ALSLEV-KIESE	I 642, II 581, III 558, IV 518/19 Reihenfolge der Intensitäten: III, II, IV, I
$Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester in Äther, Dioxan und Pyridin KIESE[2]	I 640, II 580, III 555, IV 512 Reihenfolge der Intensitäten: III, II, IV, I
Spirographisporphyrindimethylester in Chloroform WARBURG[4]. Spektrum identisch mit dem Spirographisester von FISCHER und DEILMANN[3]	I 643, II 581,5 III 558, IV 517,5 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I

der Intensitäten in Chloroform wich allerdings von der des Spirographisporphyrinesters ab.

Nach katalytischer Hydrierung des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters in Ameisensäure wurde ein Porphyrin erhalten, dessen Spektrum in Äther mit dem Spektrum des hydrierten Spirographisporphyrinesters[3] ebenfalls weitgehend übereinstimmte. Da nach der Hydrierung des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters ein Spektrum von reinem Ätiotyp resultierte, ist erwiesen, daß der Rhodotyp des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters durch eine Carbonylgruppe in einer Seitenkette bedingt war. Würde er durch eine kernständige Carboxylgruppe wie beim Rhodoporphyrin hervorgerufen, würde auch nach der Hydrierung der Rhodotyp erhalten bleiben. Diese

Tabelle 2. *Extinktionsmaxima des hydrierten $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters und des hydrierten Spirographisporphyrindimethylesters sowie des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesteroxims und des (2-Desäthyl)-2-azetylrhodoporphyrindimethylesteroxims in Dioxan.*

Hydrierter $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester in Äther	I 623, II 571, III 529, IV 496 97 Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, II, I
Hydrierter Spirographisporphyrindimethylester in Äther, FISCHER und DEILMANN[3]	I 625, II 571, III 528,7, IV 496 Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, I, II
$Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesteroxim in Chloroform	I 632, II 577, III 547, IV 509 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I
Oxim des (2 Desäthyl)-2-acetylrhodoporphyrindimethylester in Dioxan	I 631, II 575, III 548, IV 509 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I

Feststellung hat insofern Bedeutung, als das Oxim des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters in Chloroform in seinem Spektrum mit dem des Oxims des (2-Desäthyl)-2-acetylrhodoporphyrindimethylesters[5] übereinstimmt (Tabelle 2), und wir darum auch die Möglichkeit erwägen mußten, daß bei der Bildung des $Verdoglobin_{NO_2}$ eine Propionsäure bis auf ein Carboxyl oxydativ abgebaut würde.

Bei verschiedener Kristallform, abweichendem Schmelzpunkt und übereinstimmendem Spektrum des Spirographisporphyrinesters und des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters sowie der hydrierten Porphyrinester wäre es möglich, daß es sich bei dem $Verd_{NO_2}$-porphyrinester um ein dem Spirographisporphyrinester isomeres Porphyrin handelte. Bei der Überführung des Protoporphyrindimethylesters in den Spirographisporphyrindimethylester erhielten FISCHER und DEILMANN[3] in geringen Mengen einen Porphyrinester, der sich bei abweichender Kristallform und anderem Schmelzpunkt in seinem Spektrum von dem Spirographis-

[5] STERN, A., u. H. WENDERLEIN: Z. phys. Chem. **176**, 81 (1936).

porphyrinester nicht unterschied. Genauere Angaben über diesen Ester fehlen, FISCHER und DEILMANN bezeichnen ihn als Isospirographisporphyrinester[3]. Seine Kristallform, die sich genau wie beim $Verd_{NO_2}$-porphyrinester über runde Blättchen entwickelt, ähnelt der des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters. Die Schmelzpunkte beider Porphyrine liegen dicht beieinander: $Verd_{NO_2}$-porphyrinester 269° (KOFLER), Isospirographisporphyrinester 269°—271° (KOFLER). Da sich die Ester sowohl wie ihre Hydrierungsprodukte außerdem im Typ des Spektrums und der Lage der Banden gleichen, ist es sehr wahrscheinlich, daß der $Verd_{NO_2}$-porphyrinester mit dem Isospirographisporphyrinester identisch ist und nicht mit dem Spirographisporphyrinester. Bis die Identität jedoch durch weitere Untersuchungen ganz sicher erwiesen ist,

Tabelle 3. *Extinktionsmaxima des Porphyrins nach Resorcinschmelze des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters und des Spirographishämindimethylesters im Vergleich zum Deuteroporphyrindimethylester.*

Porphyrin des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters nach Resorcinschmelze in Pyridin-Äther	I 622/23, II 570, III 536, IV 498 Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, II, I
Porphyrinester des Spirographishämindimethylesters nach Resorcinschmelze in Pyridin-Äther, FISCHER und SEEMANN[6]	I 623, II 568,5, III 525,1, IV 488 Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, I, II
Deuteroporphyrindimethylester in Chloroform	I 619,9, II 575,5, III 565, IV 529,8, V 496 Reihenfolge der Intensitäten: V, IV, I, III, II

möchten wir den von uns beschriebenen Porphyrinester vorerst als *$Verd_{NO_2}$-porphyrinester* bezeichnen.

Das nach der Resorcinschmelze des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters erhaltene Porphyrin wich in seinem Spektrum in der 3. und 4. Bande von dem des Porphyrinesters, der nach der Resorcinschmelze des Spirographishämindimethylesters erhalten wurde, ab[6]. Beide Spektren zeigten darüber hinaus aber deutliche Unterschiede von dem zu erwartenden Spektrum des Deuteroporphyrindimethylesters[7, 8] (Tabelle 3).

Stärkere Abweichungen in der Lage der Absorptionsbanden gegenüber den gleichen Derivaten des Spirographisporphyrinesters zeigten das Oxim und das Nitril des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters. Auf Zusatz von Hydroxylaminhydrochlorid und wasserfreiem Natriumcarbonat zu der Lösung des Esters in Pyridin trat Blauverschiebung der Banden ein. Es

[6] FISCHER, H., u. C. v. SEEMANN: Z. physiol. Chem. **242**, 133 (1936).
[7] SCHUMM, O.: Z. physiol. Chem. **176**, 122 (1928).
[8] FISCHER, H., u. G. HUMMEL: Z. physiol. Chem. **181**, 114 (1929).

Tabelle 4. *Extinktionsmaxima der Oxime des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters und des Spirographisporphyrins.*

Oxim des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters in Chloroform	I 632, II 577, III 547, IV 509 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I
Oxim des Spirographisporphyrins in Äther (FISCHER und SEEMANN[6])	I 638–40, II 579,8, III 543, IV 507 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I

blieb zwar der Rhodotyp des Spektrums mit intensivster dritter Bande erhalten, die vierte Bande überragte jetzt aber weitaus die zweite. Lage der Maxima im Vergleich zum Spirographisporphyrinesteroxim s. Tabelle 4.

Abb. 3. Ein vom Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylester abweichendes Porphyrin, gewonnen aus Verd$_{NO_2}$. Kristallisiert aus Chloroform Äther und Chloroform-Azeton.

Unter Behandlung des Oxims mit Essigsäureanhydrid, bei der sich wahrscheinlich das Nitril bildete, trat Rotverschiebung der Banden mit deutlicherer Ausprägung des Rhodotyps auf. Außerdem war jetzt wieder, wie bei dem Verd$_{NO_2}$-porphyrinester, Bande II höher als Bande IV. Hinsichtlich der Lage der Banden zeigten sich auch hier deutliche Abweichungen vom Spirographisporphyrinnitril (Tabelle 5).

Auf Behandlung der Lösung des Verd$_{NO_2}$-porphyrinesters in Pyridin mit Benzoylchlorid, durch die bei Anwesenheit von reaktionsfähigen Hydroxylgruppen eine Einführung der Benzoylgruppe in die Molekel mit Änderung des Spektrums zu erwarten wäre, trat keine Änderung des Spektrums auf. Danach sind reaktionsfähige Hydroxylgruppen in der Molekel nicht anzunehmen.

Tabelle 5. *Extinktionsmaxima der Nitrile des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters und des Spirographisporphyrins.*

Nitril des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters in Chloroform	I 634, II 579, III 551, IV 514 Reihenfolge der Intensitäten: III, II, IV, I
Nitril des Spirographisporphyrins in Äther (FISCHER und SEEMANN[6])	I fehlt, II 581,2, III 548,6, IV 506 Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I fehlt

Nicht immer führte der eingangs dargestellte Arbeitsgang zum kristallinen $Verd_{NO_2}$-porphyrinester. Aus uns zur Zeit nicht erklärlichen Gründen erhielten wir einmal bei sonst gleichem Arbeitsgang ein Porphyrin, das in sehr feinen schräg abgeschnittenen Prismen kristallisierte und bis 350° noch keinen Schmelzpunkt zeigte (Abb. 3).

Versuche.

A. Methodik.

1. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des $Verd_{NO_2}$ wurden mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschene rote Rinderblutkörperchen benutzt.

2. Extinktionsmessungen im sichtbaren Gebiet wurden mit dem Spektrophotometer von Zeiß-Ikon durchgeführt, das vor den Messungen mit der Hg-, Cd- und Zn-Emission geeicht worden war. Als Maß für die Extinktion wurde der spezifische Extinktionskoeffizient angegeben:

$$\varepsilon = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot \log \frac{I_o}{I},$$

c = Konzentration in g/100 ml; d = Schichtdicke in Zentimeter.

3. Angaben über Stärke oder Höhe von Banden beziehen sich auf spektrophotometrische Messungen, nicht auf Schätzungen mit dem Auge im Spektroskop.

4. Die chromatographische Adsorption wurde an einer Aluminiumoxydsäule (Al_2O_3 standardisiert nach Brockmann) von 10 cm Länge und $1^1/_2$ cm Durchmesser bei mäßigem Sog der Wasserstrahlpumpe vorgenommen.

5. Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroschmelzpunktapparat nach Kofler bestimmt.

B. Darstellung des $Verd_{NO_2}$.

Die Darstellung des $Verdoglobin_{NO_2}$ aus Hämoglobin, Natriumnitrit und Wasserstoffperoxyd bei einem p_H von 6,2 erfolgte in der bereits früher beschriebenen Weise[1], wobei lediglich die Mengen der einzelnen Reaktionspartner vergrößert wurden: 1500 ml gewaschene rote Rinderblutkörperchen, 1000 ml Phosphatpuffer 0,1 ml, p_H 6,2. 105 g Natriumnitrit und 30—50 ml Wasserstoffperoxyd (30%). Der Ansatz bleibt zunächst 6—8 Std bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umrühren stehen und wird dann 3—4 Tage in Cellophanschläuchen gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Es liegt dann der grüne Farbstoff als Verdiglobin vor. Zur Darstellung größerer Mengen $Verd_{NO_2}$ erweist sich dessen Abtrennung vom Globin mit salzsaurem Azeton als am ergiebigsten und sparsamsten, da die größte Menge des Azetons durch Destillation wiedergewonnen werden kann. 110 ml mit 2 ml 20%iger Salzsäure angesäuerte Verdiglobinlösung werden aus

einer Pipette langsam unter ständigem Umrühren in 1000 ml mit 2 ml 36%iger Salzsäure angesäuertes Azeton gegeben. Vom ausgeflockten, noch etwas grün erscheinenden Protein wird abfiltriert und die Azetonlösung mit einigen ml Ammoniak alkalisch gemacht. Dabei flockt nach kurzer Zeit das $Verd_{NO_2}$ aus und setzt sich nach 24 Std ab. Das noch schwach grün gefärbte überstehende Azeton wird abgesaugt, der Rest abfiltriert und das abgetrennte $Verd_{NO_2}$ bei 37° getrocknet. Ausbeute: von 1500 ml roten Zellen 25 g rohes $Verd_{NO_2}$ mit einem Eisengehalt von 2—4%.

C. Darstellung des $Verd_{NO_2}$-porphyrinmethylesters.

Zur Enteisenung werden 6 g $Verd_{NO_2}$ in 300 ml 98%iger Ameisensäure ($d = 1{,}22$) unter gelindem Sieden gelöst. Nach dreimaliger Zugabe von 2 g Ferrum reductum in Abständen von 5 min und nach weiterem Sieden über 15 min ist aus dem $Verd_{NO_2}$ das Eisen abgespalten. Die jetzt leuchtend rote Lösung wird filtriert und mit 600 ml gesättigter Ammonium- oder Natriumazetatlösung versetzt, wobei das braunrote Porphyrin ausflockt. Nach Filtrieren und Waschen mit reichlich Wasser wird das Porphyrin bei 37° getrocknet. Ausbeute an Porphyrin etwa 1,8 g.

Die völlige Enteisenung des $Verd_{NO_2}$ ist für die Isolierung des Porphyrinesters sehr wichtig. Bei einem Ansatz wurde zur Enteisenung kein reines Ferrum reductum verwendet, so daß offensichtlich keine völlige Abtrennung des Eisens aus der prosthetischen Gruppe erfolgte. Auch in diesem Ansatz wurde ebenso wie bei alleiniger Enteisenung durch Methanol-Salzsäure die Kristallisation durch die Anwesenheit eines grünen Farbstoffes, der durch die weiteren Reinigungsschritte nicht zu entfernen war, gestört.

Das aus 6 g $Verd_{NO_2}$ gewonnene Porphyrin wird in 1200 ml Methanol gebracht, das bei Zimmertemperatur mit Chlorwasserstoff gesättigt worden ist. Nun wird 6 Std unter Rückflußkühlung gekocht, wobei Veresterung des Porphyrins eintritt. Nach dem Erkalten werden jeweils 200 ml in 600 ml Äther gegeben und bis zur alkalischen Reaktion mit 5 n Natronlauge versetzt. Von der wäßrigen Lösung wird abgetrennt, der Äther mehrmals mit Wasser gewaschen und schließlich mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Spektroskopisch zeigt der Äther mindestens 5 Banden. Zwei im Rot gelegene Banden weisen darauf hin, daß ein Gemisch mindestens zweier Porphyrine vorliegt. Die langwelligere, im Rot gelegene Bande stellt die erste Bande des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters dar, während es sich bei der im kurzwelligen Teil des Rot liegenden Bande um die erste Bande des Protoporphyrinesters handelt. Bei der weiteren Aufarbeitung, die unter ständiger spektroskopischer Kontrolle erfolgt, bildet das Intensitätsverhältnis dieser

beiden Banden ein Maß für die Reinheit des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.

Nach Chromatographie des Äthers an Aluminiumoxyd, bei der in der obersten Schicht wenig unverestertes Porphyrin entfernt wird, wird dem Äther zunächst zweimal mit 150 ml 2%iger Salzsäure, dann zweimal mit 150 ml 3%iger und schließlich mit 150 ml 4%iger HCl vorsichtig der Protoporphyrinester entzogen. Spektroskopisch soll jetzt die Bande des Protoesters im Rot nicht mehr sicher nachweisbar sein. Mit jeweils 200 ml 8%iger HCl auf 300 ml Äther wird dem Äther der $Verd_{NO_2}$-porphyrinester entzogen und sofort wieder mit 5 n Natronlauge in 200 ml peroxydfreien, destillierten Äther getrieben. Nach mehrmaligem Waschen wird der Äther mit Natriumsulfat getrocknet. Der Mutteräther, der noch schwach rotbraun gefärbt ist, enthält in geringen Mengen andere, nicht weiter isolierte Farbstoffe.

Zur weiteren Aufarbeitung wird die Ätherlösung nochmals an Aluminiumoxyd chromatographiert, wobei jetzt in der obersten Schicht der Säule nur Spuren unveresterten Porphyrins adsorbiert bleiben. Die Ätherlösung wird dann im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand in wenigen ml Chloroform aufgenommen. Die Chloroformlösung wird bis auf ein kleines Volumen eingeengt und mit der 2—3fachen Menge Äther versetzt. Nach kurzem Stehen fällt der $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester aus. Eine einheitliche Kristallform liegt zunächst noch nicht vor. Das Spektrum der Mutterlauge zeigt noch die Anwesenheit von Protoporphyrinester. Erst nach 5—6maliger Umkristallisation aus Chloroform-Äther bilden sich gleichmäßige, runde Kristalle aus, deren Schmelzpunkt bei 255–257° (Kofler) liegt. Zur weiteren Reinigung wird jetzt 3—4mal aus Chloroform-Azeton umkristallisiert. Dabei ändert sich die Kristallform. Der $Verd_{NO_2}$-porphyrinester liegt jetzt in etwa rhombischen Kristallen mit abgerundeten stumpfen Winkeln vor (Abb. 1). Der Schmelzpunkt liegt jetzt bei 269° (Kofler) und ändert sich auch bei weiterem Umkristallisieren nicht. Auch erneute Umkristallisation aus Chloroform-Äther führt zu keinem höheren Schmelzpunkt. Dabei kristallisiert der Ester jetzt in lanzettförmigen Kristallen, die vielfach in Rosettenform angeordnet sind (Abb. 2). Ausbeute: aus 10 g $Verd_{NO_2}$ etwa 2 mg Porphyrinester.

Bei der Darstellung des $Verdoglobin_{NO_2}$ handelt es sich um eine Oxydation der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes. Durch die längere Behandlung des $Verd_{NO_2}$ mit Ameisensäure-Eisen erfolgt offenbar eine Reduktion, da sich später das Verhältnis des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters zum Protoester gegenüber dem ursprünglichen Verhältnis $Verd_{NO_2}$ zu Häm erheblich zu Ungunsten des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters verschiebt. Neben der Reduktion durch Ameisensäure-Eisen entstehen durch die unvollkommene Veresterung mit

Methanol-Salzsäure, die Salzsäure-Ätherfraktionierung und die sehr häufige Umkristallisation bis zur völligen Reinigung des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters größere Substanzverluste, so daß vorerst die Ausbeute bei der Darstellung des $Verd_{NO_2}$-porphyrinesters sehr gering ist.

D. Chromatographisches Verhalten des Gemisches von Proto- und $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester.

1. Al_2O_3, standardisiert nach BROCKMANN, $10/1^1/_2$ cm, mit Methanol-HCl präpariert. Das Gemisch von Proto- und $Verd_{NO}$-porphyrinester wird in Methanol-HCl auf die Säule gegeben. Es bildet sich eine mäßig grün gefärbte Schicht, die keine Unterteilung aufweist. Nach Zugabe von salzsaurem Methanol wandert die Zone ohne Schichtenbildung geschlossen abwärts. Aus der Säule erfolgt mit Chloroform gute Elution.

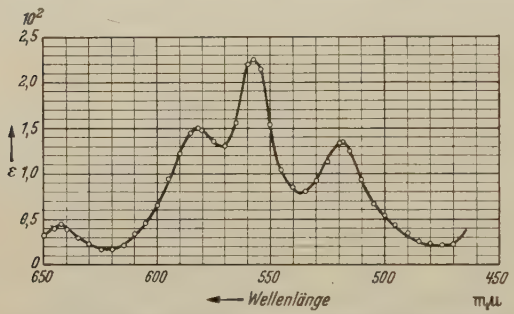


Abb. 4. Extinktion des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters in Chloroform. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Spezifischer Extinktionskoeffizient $\varepsilon = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot \log \frac{I_o}{I}$, c Konzentration in g/100 ml, d Schichtdicke in Zentimeter.

2. Säule wie oben. Aluminiumoxyd mit Äther eingeschlemmt. Das Gemisch der beiden Ester wird nach Überführung in Äther auf die Säule gegeben und mit Äther nachgewaschen. Dabei wandert eine rote Farbzone gleichmäßig durch die Säule. Spektroskopisch zeigt die ätherische Farblösung ein doppeltes Porphyrinspektrum mit 2 intensiven Banden im Rot. In der obersten Schicht der Säule bildet sich eine dunkelbraune Zone, die mit Äther nicht, mit Chloroform sehr schlecht, dagegen sehr gut mit Methanol aus der Schicht zu eluieren ist. Die Methanollösung gibt das gleiche doppelte Porphyrinspektrum wie die durchgelaufene Ätherlösung.

3. Nach Überführen des Porphyringemisches aus Methanol in Äther wird der Äther im Vakuum verjagt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die Chloroformlösung zeigt gegenüber der Ätherlösung unverändertes doppeltes Porphyrinspektrum.

Säule wie oben. Aluminiumoxyd mit Chloroform eingeschlemmt. Beim Durchlaufen der Chloroformlösung ist dasselbe Verhalten wie bei der Chromatographie der Ätherlösung zu beobachten. Eine rote Zone wandert auf Nachwaschen mit Chloroform oder Äther gleichmäßig durch die Säule, eine Trennung der beiden Porphyrinester findet nicht statt.

4. Das Methanol, mit dem der in der obersten Schicht adsorbierte Farbstoff eluiert ist, wird mit Chlorwasserstoff gesättigt und 3 Std unter Rückflußkühlung gekocht. Nach Überführen in Äther mit 5 n Natronlauge wird der Äther wie oben an Aluminiumoxyd chromatographiert. Der größte Teil des Farbstoffes wandert jetzt durch die Säule, während in der obersten Schicht nur wenig brauner Farbstoff adsorbiert wird.

E. Spektrophotometrische Untersuchung des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.

3,2 mg kristalliner $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylester werden in 10 ml Chloroform gelöst. Von Verdünnungen dieser Lösung werden quantitative Absorptionsspektren aufgenommen. Die Absorptionsmaxima liegen in allen Kurven bei 642, 581, 558 und 518/19 mμ. Das Spektrum zeigt Rhodotyp, Reihenfolge der Intensitäten III, II, IV, I (s. Abb. 4). Die gemessenen Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6. *Spezifische Extinktionskoeffizienten des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters in Chloroform.*

$\varepsilon = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot \log \frac{Io}{I}$, c Konzentration in g/100 ml, d Schichtdicke in Zentimeter.
(Mittelwert aus 2 Absorptionskurven verschiedener Konzentration.)

Wellenlänge mμ	ε	Wellenlänge mμ	ε	Wellenlänge mμ	ε
650	31,6	585	143,9	525	114,0
645	40,6	581	150,9	520	131,7
642	43,9	580	149,5	518/19	134,7
640	38,7	575	135,6	515	125,0
635	30,5	570	131,3	510	92,9
630	20,3	565	154,8	505	68,3
625	18,5	560	219,2	500	54,1
620	18,5	558	224,4	495	41,7
615	21,1	555	215,6	490	34,4
610	35,3	550	152,4	485	26,1
605	44,5	545	103,1	480	21,9
600	66,2	540	85,8	475	20,6
595	94,2	535	80,3	470	21,4
590	121,5	530	91,2	465	40,0

F. Röntgenuntersuchung des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.

Die Röntgenuntersuchung des $Verd_{NO_2}$-porphyrindimethylesters wurde von Herrn Prof. Dr. J. Leonhardt und Dr. W. Berdesinski, Mineralogisches Institut der Universität Kiel durchgeführt*. Sie gaben uns darüber folgenden Befund:

* An dieser Stelle möchten wir Herrn Prof. Dr. J. Leonhardt und Herrn Dr. Berdesinski für die Ausführung der Untersuchung danken.

Von dem uns übergebenen Präparat wurden unter folgenden Aufnahmebedingungen Debyeogramme angefertigt: Müller-Mikro 60-Röntgenapparatur, Cu-Kα-Strahlung, Ni-Filter, Blendendurchmesser 1,0 mm Kameradurchmesser 57,3 mm.

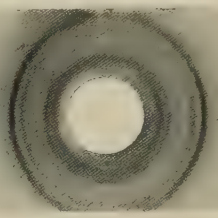


Abb. 5. Röntgendiagramm des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters. Präparat sechsmal aus Chloroform-Äther und anschließend fünfmal aus Chloroform-Azeton umkristallisiert.

Expositionszeiten 4 und 8 Std bei 40 KV und 20 mA. In der angehängten Tabelle (s. Tabelle 7) sind die jeweiligen geschätzten Intensitäten und die gemessenen ϑ-Werte der auftretenden Linien aufgeführt. Die Zufügung einer Eichsubstanz mußte unterbleiben, da das Präparat noch zu weiteren Untersuchungen benutzt werden sollte. Die ϑ-Werte der 16. und der folgenden Linien sind nur größenordnungsmäßig angegeben, da eine genaue Vermessung dieser Linien wegen ihrer äußerst schwachen Intensität nicht möglich war. Das Röntgendiagramm ist in Abb. 5 wiedergegeben.

Tabelle 7. *Auswertung des Röntgendiagramms des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.*

Lfd. Nr.	Geschätzte Intensität	Beobachtete ϑ-Werte Grad
1	mittel	5,9
2	s. stark	7,1
3	stark	8,25
4	mittel	9,65
5	stark	11,35
6	s. s. stark	12,85
7	schwach	14,2
8	schwach	15,25
9	schwach	16,5
10	s. schwach	18,7
11	mittel-schwach	20,2
12	schwach	21,1
13	schwach	23,0
14	schwach	24,3
15	mittel-schwach	25,8
16	Intensität so schwach, daß genaue Winkelangabe nicht möglich	~27,9
17		~29,8
18		~34,0
19		~41,5
20		~45,0

Die Symmetrie der Kriställchen könnte mit Rücksicht auf Form und optisches Verhalten monoklin sein. Diese Frage konnte aber auf Grund des vorliegenden Materials nicht geklärt werden. Die Kristallplättchen haben folgenden Querschnitt: an zwei gegenüberliegenden Ecken verrundete, schiefwinklige Parallelogramme.

G. Hydrierung des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.

Eine kleine Menge kristallinen Verd$_{NO_2}$-porphyrinesters (weniger als 0,5 mg) wird in 4 ml wasserfreier Ameisensäure gelöst und 50 mg 10%iger Palladiumasbest hinzugegeben. Es wird dann 2 Std bei Zimmertemperatur durch Einleiten von Wasserstoff hydriert. Die ursprünglich blauviolette Farbe der Lösung schlägt dabei in eine mehr rötliche um. Vom Palladiumasbest wird abfiltriert und die Ameisensäure in etwa 20—30 ml Äther gegeben. Nachdem der Äther bis zur neutralen Reaktion gewaschen worden ist, wird das Porphyrin dem Äther mit 1%iger Salzsäure entzogen und sofort wieder mit gesättigter Natriumazetatlösung in frischen Äther getrieben. Der Äther wird noch zweimal mit Wasser gewaschen und dann mit Natriumsulfat getrocknet. Spektrum in Äther: I 623 II 571 III 529 IV 496/97 mμ. Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, II, I.

H. Resorcinschmelze des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesters.

Eine kleine Menge kristallinen Verd$_{NO_2}$-porphyrinesters (weniger als 0,5 mg) wird mit 50 mg Resorcin vermischt und 20 min bei 180 bis 200° geschmolzen. Die Schmelze wird in 0,5 ml Pyridin aufgenommen und anschließend in 15 ml Eisessig-Äther (1:3) gegeben. Durch reichliches Waschen mit Wasser wird das Pyridin und der Eisessig entfernt. Die Waschflüssigkeit ist von gelber Farbe ohne ein bandenförmiges Spektrum. Dann wird dem Äther mit 3,6%iger Salzsäure die Hauptmenge des Porphyrins entzogen und sogleich wieder mit gesättigter Natriumacetatlösung in frischen Äther getrieben. Der Äther wird gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Fraktionierung wird mit 3,6%iger Salzsäure noch einmal wiederholt und anschließend die getrocknete Ätherlösung auf ein kleines Volumen eingeengt. Spektrum in Äther: I 622/23 II 570 III 536 IV 497/98 mμ. Reihenfolge der Intensitäten: IV, III, II, I.

I. Darstellung des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesteroxims.

1 mg kristalliner Verd$_{NO_2}$-porphyrinester wird in einigen ml analysenreinem Pyridin aufgenommen und bis zum gelinden Sieden erhitzt. Dann werden 80 mg Hydroxylaminhydrochlorid und 80 mg wasserfreies Natriumcarbonat hinzugegeben, noch 10 min im Sieden gehalten und heiß filtriert. Im Vakuum wird auf 1—2 ml eingeengt und vorsichtig mit heißem Wasser versetzt. Nach längerem Stehen im Eisschrank tritt fast vollständige Ausflockung eines braunroten Farbstoffes auf, der abzentrifugiert und mehrfach mit Wasser und Methanol gewaschen wird. Mikroskopisch handelt es sich um kleinste, rund erscheinende

Partikel. Der Versuch einer Kristallisation aus Chloroform-Methanol führt ebenfalls zu diesen kleinsten Teilchen, deren genaue Form infolge der Kleinheit nicht festzustellen ist.

Der Farbstoff wird in Chloroform aufgenommen und an Aluminiumoxyd (standardisiert nach BROCKMANN), das mit Chloroform in ein 15/1 cm Rohr eingeschlemmt wurde, chromatographiert. In der obersten Schicht werden geringe Mengen eines braunen Farbstoffes adsorbiert, der mit Methanol zum Teil eluierbar ist, jedoch kein Bandenspektrum zeigt. Offenbar handelt es sich um Verunreinigungen. Dagegen wandert eine gleichmäßige rosarote Zone unter Nachwaschen mit Chloroform geschlossen durch die Säule. Wegen der geringen Menge wird von dem Versuch einer Kristallisation abgesehen und lediglich ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Spektrum in Chloroform: I 632 II 577 III 547 IV 509 mμ. Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, II, I.

J. Darstellung des Verd$_{NO_2}$-porphyrindimethylesternitrils.

Die Lösung des Verd$_{NO_2}$-porphyrinesteroxims in Chloroform wird im Vakuum zur Trockne gebracht und das rückständige Oxim in einigen ml Essigsäureanhydrid aufgenommen. Nachdem etwa 5 min bis zum Sieden erhitzt worden ist, wird das Essigsäureanhydrid im Vakuum verjagt und der rückständige Farbstoff in Chloroform aufgenommen und wie das Oxim an Al_2O_3 chromatographiert. Auch hier wandert unter Nachwaschen mit Chloroform eine gleichmäßige rosarote Zone durch die Säule. Nach Einengen dieser Farblösung wird das Spektrum aufgenommen. Spektrum in Chloroform: I 634 II 579 III 551 IV 514 mμ. Reihenfolge der Intensitäten: III, II, IV, I.

K. Ein von dem Verd$_{NO_2}$-porphyrinester verschiedenes Porphyrin aus dem Verd$_{NO_2}$.

Ein nach dem üblichen Arbeitsgang gewonnener Ansatz von Verd$_{NO_2}$-porphyrinester zeigte nach dreimaliger Kristallisation aus Chloroform-äther noch keine einheitlichen Kristalle. Er wurde mehrere Wochen im Vakuumexsikkator im Eisschrank aufbewahrt und dann weiterverarbeitet. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Chloroform-Azeton traten jetzt sehr schräg abgeschnittene Kristalle auf, die auch bei weiterer Umkristallisation ihre Form nicht änderten. Ein Schmelzpunkt wurde bis 350° nicht beobachtet. Spektrum in Chloroform: I 643 II 590 III 558 IV 518 mμ. Reihenfolge der Intensitäten: III, IV, I, II. Auffallend hohe 1. Bande.

Weitere Untersuchungen mit diesem Porphyrin wurden bisher nicht durchgeführt.

Zusammenfassung.

Aus dem $Verd_{NO}$ wurde der bereits früher beschriebene Porphyrindimethylester rein dargestellt. Nach der Kristallform, dem Schmelzpunkt und dem chromatographischen Verhalten besteht keine Identität mit dem Spirographisporphyrindimethylester. Das Spektrum des Oxims und des Nitrils des $Verd_{NO}$-porphyrinesters zeigt ebenfalls erhebliche Abweichungen von den Spektren der entsprechenden Derivate des Spirographisporphyrinesters.

Dagegen besteht eine Ähnlichkeit bezüglich der Kristallform, des Schmelzpunktes und des spektralen Verhaltens mit dem Isospirographisporphyrindimethylester von Fischer und Deilmann. Solange eine Identität dieser beiden Porphyrine jedoch nicht eindeutig bewiesen ist, bezeichnen wir den von uns aus dem $Verd_{NO}$ dargestellten Porphyrinester als den $Verd_{NO}$-porphyrindimethylester.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 540—546 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.

Über die stabilisierende Wirkung von Borationen auf biologisch wirksame Brenzkatechinderivate.

Von

Hans Friedrich Zipf.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Februar 1949.)

Schon bald nach der Entdeckung des Adrenalins setzten die Bemühungen ein, seine Lösungen haltbarer zu machen bzw. seine Wirkung im Organismus zu verlängern. Entsprechend den zweierlei Angriffspunkten konnte dabei sowohl an eine Hemmung der Abbauvorgänge an den phenolischen OH-Gruppen als auch an der aminhaltigen Seitenkette gedacht werden. Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich nicht mit einer Beeinflussung der Brenzkatechinoxydase oder der Aminooxydase, sondern mit der Frage der Stabilisierung in vitro. Der von der Brenzkatechinoxydase katalysierte Vorgang der Oxydation des Adrenalins zum Adrenalin-o-chinon („Omega"-Adrenalin) vollzieht sich bekanntlich auch im Reagenzglase, besonders rasch im alkalischen, aber auch schon im schwach sauren Milieu. Dieser ersten Abbaustufe folgt der Ringschluß der aminhaltigen Seitenkette (Adrenochrom) und schließlich der Übergang zu einem, den Melaninen nahestehenden gelbbraunen Pigment. Die sekundären Abbaustufen haben die „Omega"-Phase zur Voraussetzung. Es gelingt also die Haltbarmachung von Adrenalinlösungen, wenn wir die Ausbildung der Phase des Orthochinons verhindern.

Das einfachste Verfahren besteht in der *Abschließung des Luftsauerstoffs*, z. B. durch Ersatz der Luft in den Ampullen durch CO_2[1, 2] oder Stickstoff[3, 4] oder durch eine feine Verteilung des Adrenalins in Olivenöl[5] bzw. Erdnußöl[6]. Andere Autoren setzten *Reduktionsmittel* hinzu, z. B. Alkalibisulfit[4, 7, 8, 9, 10, 11, 12] oder *Redoxsubstanzen* wie Leukomethylenblau[13], Thiophenol, Cystein, Thioglykolsäure[14], p-Merkaptobenzolsulfon-, β-Merkaptopropion-, Thiosalicyl-, Thiomilchsäure, Äthyl- oder Benzylmerkaptan, Thiosinamin, Thiokresol und Thiosemikarbazid-HCl[15]. Einen ausgezeichneten Stabilisator fand Abderhalden[16] in der Askorbinsäure. Ihre oxydationshemmende Wirkung will man z. B. mit einer Hemmung ihrer eigenen Oxydation durch Eisen erklären[17]. Marquardt[18, 29] führte ein Adrenalinaskorbinat unter den Namen „*Tonhormon*" als oxydationsbeständiges Produkt in die Therapie ein. Von sonstigen Stabilisatoren werden genannt der natürliche (nicht aber der synthetische) Kampfer[19], Thymol[19], weiterhin Guanidinsalze[20] und Benzoesäure[21].

Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung bietet die *Blockade der phenolischen OH-Gruppen durch Bildung von Komplexverbindungen.*

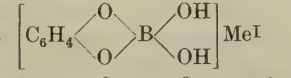
Die Zahl der Elemente, die innerkomplex an Brenzkatechin und seine Derivate gebunden werden können, ist eine recht große. Nach PFEIFFER[22] kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

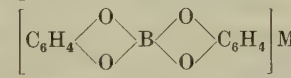
Mn II	Fe II	Co II	Ni II	Cu II	Zn II	Be II	Mg II	Sr II
Cr III	Mn III	Fe III	B III	Al III	As III	Sb III	Bi III	
Si IV	Sn IV	Ti IV	Zr IV	Th IV				
Mo V	As V	Sb V						
Mo VI	W VI							

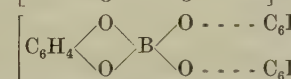
Von besonderer Bedeutung für die Brauchbarkeit solcher Komplexe ist ihre Löslichkeit und die weitgehende Ungiftigkeit der komplexgebundenen Elemente. Diese Voraussetzungen erfüllen die Komplexverbindungen der Brenzkatechinderivate mit Borationen.

Schon vor einigen Jahrzehnten wurde eine haltbare reizlose Adrenalinlösung dadurch erzielt, daß man ein Salz der Borsäure mit Adrenalin in molekularen Mengen unter Anwesenheit von Wasser bzw. physiologischer NaCl-Lösung zusammenbrachte (s. bei VINCKE[23], S. 71). Man erhält in Wasser leicht lösliche Verbindungen des Adrenalins, wenn man wäßrige Lösungen aus (1 Mol) Adrenalin und (1,5 Mol) Borsäure oder Arylborsäure bei 50—60° im Vakuum zur Trockene eindampft oder mit Alkohol fällt. Statt Borsäure kann man auch Phenyl- oder Tolylborsäure verwenden.

Die Verhältnisse bei der Bildung von Borsäurekomplexen mit Polyoxyverbindungen sind inzwischen weitgehend geklärt worden[24, 25, 26]. In einer vorangehenden Mitteilung konnten H. F. ZIPF und G. STEPHAN[27] Änderungen der Wirkung von Borsäure durch die Anwesenheit aliphatischer Polyoxyverbindungen nachweisen. Auch aromatische Polyoxyverbindungen sind als Reaktionspartner geeignet, aber nur, wenn sie mindestens 2 benachbarte OH-Gruppen auf derselben Seite tragen, also z. B. Brenzkatechin und Pyrogallol, nicht aber Resorcin oder Phloroglucin. Auf präparativem Wege sind bisher 3 Typen von Brenzkatechinderivaten erhalten worden:

Monobrenzkatechinborata 

Dibrenzkatechinborate 

Tribrenzkatechinborate 

Die Stabilität der Monokomplexe ist groß, weshalb diese den allergrößten Anteil der in Lösung befindlichen Komplexe darstellen; die der Dikomplexe ist gering. Trikomplexe sind bisher nur in unmerklicher Konzentration nachgewiesen worden.

Unsere eigenen Untersuchungen sollen einerseits einen Beitrag zum Problem der Stabilisierung von Brenzkatechin und seinen biologisch wirksamen Derivaten Arterenol, Adrenalin, Aludrin und Corbasil darstellen, andererseits den besonderen Charakter der Borsäure (Borationen) behandeln. Darüber hinaus ergeben sich praktische Hinweise für die Verwendung von Boratpuffern.

Versuchsergebnisse.

In unseren ersten Versuchen setzten wir Adrenalin- und Aludrinlösungen 1:1000 so viel Borsäure hinzu, daß ein molares Verhältnis Diol:Borsäure = 1:1 bis 1:4 bestand. Das p_H wurde auf 7,0 eingestellt. Wir beobachteten gegenüber den borsäurefreien Kontrollen eine nicht sehr starke, aber deutliche Hemmung der spontanen Oxydation zum roten und der Weiterbildung zum gelbbraunen Farbstoff. Das optimale Mischungsverhältnis lag schon bei 1:2. Bei Verwendung von Phosphatpuffer (SÖRENSEN) zwischen 7,3—8,2 verringerte sich der oxydationshemmende Effekt der Borsäure (bzw. Borationen). In einer p_H-Reihe von 4,0—11,8 fiel die Wirkung im Phosphatpufferbereiche am geringsten aus.

Für die weiteren Versuche wählten wir die Puffer Borat/0,1 n HCl nach SÖRENSEN und 0,2 n NaOH/Borsäure-KCl nach CLARK und LUBS, für die boratfreien Kontrollösungen den Puffer 0,1 n NH_4Cl/NH_3 nach MICHAELIS. Der Boratgehalt der Puffermischungen betrug somit ein Vielfaches der an sich erforderlichen Menge. Wir bewegten uns dabei mit Absicht in einem alkalischen Milieu zwischen 8,0—9,0, ausgehend von der Tatsache, daß darin die Dissoziation von Borationen besonders groß ist, und daß Borationen die freie Borsäure in ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung erheblich übertreffen. Andererseits ist die Stabilisierung von biologisch wirksamen Brenzkatechinderivaten gerade im alkalischen Bereiche erwünscht, weil hier die Oxydationsvorgänge beschleunigt sind. Bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen lassen sich Adrenalinlösungen ohne weiteres in ihrem oxydativen Abbau hemmen, allerdings nur bei stärkerer Azidität (MARQUARDT[28]). Bei p_H-Werten zwischen 8,0—9,0 konnten wir feststellen, daß m/183 Brenzkatechin, Arterenol, Adrenalin (m/183 = 1:1000), Corbasil und Aludrin in beiden Boratpuffern sehr stark in ihrer spontanen Oxydation gehemmt wurden. Die so stabilisierten Lösungen hatten sich nach einigen Tagen nur leicht gelblich, nach mehreren Wochen gelb verfärbt, während die boratfreien Vergleichslösungen inzwischen eine tiefbraune Farbe angenommen hatten. Die Abb. 1 und 2 geben den Ablauf der Oxydationsvorgänge auf Grund von Extinktionsmessungen mit dem PULFRICH-Photometer (Filter S 50) wieder. Auch das HAVEMANN-Photometer (Filter BG 7 und GG 11) erwies sich für die „rote Phase" als gut geeignet (s. MARQUARDT[28]).

In dem ganzen oxydativen Umwandlungsprozeß treten bekanntlich zwei Hauptphasen besonders hervor, eine rote, entsprechend den beiden ersten Oxydationsprodukten Adrenalin-o-chinon und Adrenochrom und eine gelbbraune, entsprechend einem, den Melaninen nahestehenden Farbstoff. Dazwischen befindet sich außerdem noch ein hellgrün und ein blauviolett fluoreszierendes Oxydationsprodukt, deren Platz noch nicht genau feststeht. Adrenalin-o-Chinon besitzt noch völlig die offene Seitenkette des Adrenalins und ist wie dies blut-

druckwirksam. Das Adrenochrom (dem Hallachrom nahestehend) ist mit der aminhaltigen Seitenkette irreversibel ringgeschlossen und blutdruckunwirksam. Da beide Körper, wie alle o-Chinone, rot gefärbt sind, kann bekanntlich aus der Rotfärbung einer Adrenalinlösung wohl mit großer Wahrscheinlichkeit, aber nicht mit Sicherheit auf den Verlust der Blutdruckwirksamkeit geschlossen werden (s. bei MARQUARDT[28, 29]). Die Paare Adrenalin-o-chinon und Adrenalin, sowie Adrenochrom und Leukadenochrom stellen wichtige Oxydo-Reduktionssysteme im Stoffwechsel der Zelle dar.

Wie aus dem für p_H 9,1 gewählten Beispiel der Abb. 1 hervorgeht, zeigten sich je nach der Struktur der untersuchten Brenzkatechinderivate Unterschiede in dem Ausmaße und der Geschwindigkeit des Auftretens und des Ablaufes der „roten Phase", und zwar in der Reihenfolge Adrenalin, Aludrin, Corbasil und Arterenol. Die beginnende Entwicklung der gelben Farbstufe ist an dem Abfall der Kurve erkennbar, so daß in diesem Teile (sich laufend ändernde) Mischungen beider Farbstufen vorliegen. Dem Ende der „roten Phase" entspricht der tiefste Punkt der Kurven. Corbasil hebt sich durch das lange Bestehenbleiben, Arterenol durch die sehr späte und fast fehlende Ausbildung der roten Oxydationsstufe von den übrigen Körpern besonders ab. Rein äußerlich läßt sich in den boratfreien Corbasillösungen das Bestehenbleiben des roten Farbtones neben dem gelben Farbton noch tagelang erkennen, und zwar um so mehr, je näher die p_H-Werte bei p_H 7,0 liegen. Die borathaltigen Lösungen werden in dieser ersten Phase praktisch nicht verändert. Die Reaktionen nach FOLIN-DENIS und VULPIAN (Modifikation nach EULER) fallen in ihnen bei allen 4 Derivaten deutlich schwächer aus. Man kann die stabilisierende Wirkung der Boratpuffer bis zu einer Konzentration 1:1000000 (eines der vier Brenzkatechinderivate) deutlich ad oculos nachweisen.

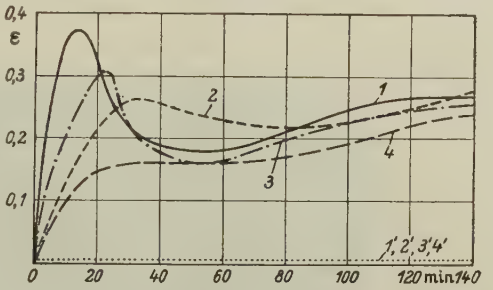


Abb. 1. Stabilisierende Wirkung von Borationen in der „roten Phase". PULFRICH-Photometer. Filter S 50. *1* m/183 Adrenalin (=1:1000). *2* m/183 Corbasil; *3* m/183 Aludrin; *4* m/183 Arterenol in 0,1 n NH_4Cl/NH_3 (MICHAELIS). p_H = 9,1. *1'*, *2'*, *3'*, *4'*, m/183 derselben Stoffe in „Borat"/0,1 n HCl (SÖRENSEN). p_H = 9,1.

Verfolgt man die Extinktion über einen längeren Zeitraum, dann tritt gegenüber dem jeweils minimalen Anteil an roter Farbstufe praktisch nur die gelbbraune Farbe in Erscheinung (Abb. 2). Die rote Phase kommt in diesem Kurvenverlaufe nicht mehr zum Ausdruck. Die Extinktion erreicht bei Brenzkatechin und bei allen Derivaten nach einigen Wochen ein kontinuierliches Maximum. Die steilere Anfangsphase stimmt bei allen Stoffen überein, im späteren Kurven-

verlaufe zeigen sich Unterschiede hinsichtlich des erreichten Endstadiums an gelbbraunem Farbstoff in der Reihenfolge Adrenalin, Corbasil, Aludrin. Die Extinktion von Arterenol ließ sich nur bis zum 6. Tage verfolgen, danach kam es zur Ausbildung eines schwarzbraunen Sediments. Im Vergleich zu den boratfreien Lösungen zeigten alle Stoffe in beiden Boratpuffern einen deutlichen Stabilisierungseffekt. Die geringe, nur allmählich zunehmende Verfärbung beruht zunächst auf einem viele Stunden bis tagelangem Bestehenbleiben der „roten Phase", die nur allmählich in eine gelbe Phase übergeht. Der rote Farbstoff war in der Nähe von p_H 8,0 beständiger als bei p_H 9,0. (In allen borathaltigen Lösungen war auch das Auftreten des grün fluoreszierenden Farbstoffes zu beobachten.) Es handelt sich bei diesem quantitativ geringfügigen Verfärbungsvorgang um eine Oxydation der noch freien Moleküle der Brenzkatechinderivate. Da ein Gleichgewicht vorliegt, etwa zwischen Adrenalinborat, Borationen und freiem Adrenalin, handelt es sich nicht um eine Komplexbildung mit allen Molekülen, wohl aber mit dem größten Teile. Der Zusatz von Borationen bedeutet also keine völlige Aufhebung der Oxydationsvorgänge, immerhin eine erhebliche Einschränkung, also eine *partielle Stabilisierung in vitro*.

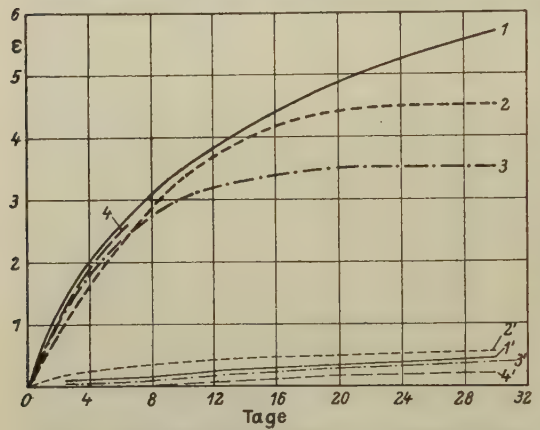


Abb. 2. Stabilisierende Wirkung von Borationen in der „gelbbraunen Phase" bei p_H 9,1. PULFRICH-Photometer. Filter. Sonstige Angaben siehe bei Abb. 1.

Entsprechend der augenscheinlich und photometrisch nachweisbaren Stabilisierung wurde erwartet, daß auch die pharmakologische Wirkung erhalten blieb. Dabei konnte der Helligkeitsgrad nicht unbedingt als Maß für die biologische Wirksamkeit gelten, denn auch farblose Lösungen können bis zu 50% ihrer Wirksamkeit eingebüßt haben. Der Zusatz von Formaldehyd sichert z. B. ein dauernd farbloses Aussehen, vernichtet aber die Blutdruckwirksamkeit völlig. Die *Prüfung am isolierten Rattenkolon* ergab für die stabilisierten Adrenalin- und Aludrinlösungen noch nach 4—5 Wochen einen Effekt bis zu $^2/_3$ der ursprünglichen Wirksamkeit, während die boratfreien Lösungen sich völlig oder fast völlig unwirksam verhielten. Der *Nachweis der erhaltenen Wirkung am Blutdruck* (der normalen und der dekapitierten

Katze, sowie des normalen und atropinisierten Kaninchens) ist an dem Beispiel der Abb. 3 ersichtlich.

Ob der Schutzeffekt der Borationen in quantitativer Hinsicht ausreicht, um beispielsweise bei peroraler Medikation die Resorption genügend hoher Mengen von biologisch wirksamen Brenzkatechinderivaten zu gewährleisten, kann man nur aus einer großen Zahl von entsprechenden Versuchen ableiten. Bei einer Verdünnung der stabilisierten Lösungen von Adrenalin, Corbasil und Aludrin mit Wasser lag die unterscheidbare Stabilisierungsgrenze noch nach 3 Tagen bei 1 : 256000—1 : 512000. Die Fraglichkeit der peroralen Wirksamkeit gilt sicherlich auch bei anderen Stabilisatoren, ganz abgesehen davon, daß diese sich durch Selbstoxydation in den Handelslösungen verbrauchen können.

Günstiger liegen die Verhältnisse bei der externen Therapie. Hier läßt die Kombination von Borsäure, besonders aber von Boraten,

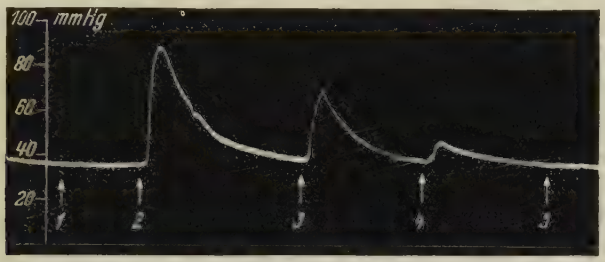


Abb. 3. Blutdruck der dekapitierten Katze; 1,25 kg; ♂. Nachweis der stabilisierenden Wirkung von Borationen. *1* und *5* 50 γ aus einer Lösung von Adrenalin 1:1000 in 0,1 n NH_4Cl/NH_3 (MICHAELIS), p_H 9,0, 30 Tage alt, dunkelbraun verfärbt; *2* 50 γ aus einer frischen Adrenalinlösung 1:1000; *3* 50 γ, *4* 10 γ, aus einer Lösung von Adrenalin 1:1000 in „Borat"/0,1 n HCl (SÖRENSEN), p_H 9,0. 30 Tage alt, gelblich verfärbt.

nicht nur mit aliphatischen, sondern auch mit aromatischen Polyoxyverbindungen an manche Möglichkeit denken. Salbenansätze von Adeps. lan. anhydr. und Boratpuffer (p_H = 9,0), die m/183 Adrenalin, Corbasil oder Aludrin enthielten, zeigten nach einigen Tagen an der Oberfläche einen deutlichen Stabilisierungseffekt gegenüber den boratfreien Salben mit gleichem p_H. Im Salbeninnern selbst bedingt allerdings der mangelnde Kontakt mit dem Luftsauerstoff auch bei den boratfreien Salben eine praktisch genügende Unterbindung der Oxydationsvorgänge.

Wir wollen zum Schlusse auf den möglichen Einfluß hinweisen, den die Boratpuffer auf alle Vorgänge in vitro ausüben können, bei denen aliphatische oder aromatische Polyoxyverbindungen vorkommen. Die augenscheinlich schon erkennbare Oxydationshemmung solch geringer Konzentrationen wie 1:1000000 aller unserer Brenzkatechinderivate in den Boratpuffern läßt auch bei anderen Polyoxyverbindungen an nachteilige Substratbeeinflussungen denken. Sie wirft jedenfalls ein bezeichnendes und warnendes Licht auf die Rolle der Boratpuffer. Diese dürfen deshalb nur unter besonderen Bedingungen Verwendung finden.

Zusammenfassung.

Die Fähigkeit der Borationen, mit aromatischen Polyoxyverbindungen Komplexe zu bilden, ermöglicht durch Blockade an den phenolischen OH-Gruppen die Hemmung der spontanen Oxydation von Brenzkatechin und seinen biologisch wirksamen Derivaten Ar-Arterenol, Adrenalin, Corbasil und Aludrin. Als borathaltige Lösungsmittel eignen sich besonders die üblichen Boratpuffer. Deren augenscheinliche und photometrisch nachweisbare, stabilisierende Wirkung nimmt mit steigender Basizität immer mehr zu, um bei etwa $p_H = 9{,}0$ fast vollständig zu sein. In der „roten Phase" läßt sich der Effekt bei allen vier Brenzkatechinderivaten bis zu einer Konzentration von 1:1000000 nachweisen. Am isolierten Rattenkolon wurde für Aludrin und Adrenalin, am Blutdruck des normalen und dekapitierten Tieres (Kaninchen und Katzen) für Adrenalin noch nach mehreren Wochen eine zu $^1/_3$—$^3/_4$ erhalten gebliebene Wirksamkeit deutlich nachgewiesen.

Literatur.

[1] Van Esveld, L., u. H. van Genderen: Ndld. Tschr. Geneesk. **86**, 2049 (1942). — [2] Rowlinson, H., and S. W. Underbill: Quart. J. Pharmacy **12**, 392 (1939). — [3] Bukowski, A.: Poln. Pat. 13966, 1929. Zit. nach Chem. Zbl, **1932 II**, 2079. — [4] Goris, A., et A. Legroux: Bull. Acad. Méd. ,Par. **115**, 864 (1936). — [5] Keeney, E.: Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **112**, 227 (1938). — [6] Keeney, E., J. Pierce and L. N. Gay: Arch. int. Med. (Am.) **63**, 119 (1939). — [7] Bridel, M.: J. Pharmacie et Chim. **27**, 166. — [8] Mazot, H.: Bull. Sci. pharmacol. **31**, 88 (1924). — [9] Malmy: J. Pharmacie et Chim. **6**, 401 (1927). — [10] Julien, L.: J. Pharmacie et Chim. **22**, 53 (1935). — [11] Sjörgren, B.: Schwed. Pat. 86898, 1937. Zit. nach Chem. Zbl. **1937 I**, 1190. — [12] Wrolfe, G.: Quart. J. Pharmacy a. Pharmacol. **14**, 56 (1941). — [13] D.R.P. 646561, 1937, Nordmarkwerke, Hamburg. Zit. nach Chem. Zbl. **1937 II**, 1405. — [14] D.R.P. 642378, 1937, I.G.-Farbenind. Zit. nach Chem. Zbl. **1937 I**, 5050. — [15] Am. Pat. 2047144 Zit. nach Chem. Zbl. **1936 II**, 2168. — [16] Abderhalden, E.: Fermentforsch. **14**, 367 (1934). — Med. Klin. **32**, 538 (1936). — [17] Green, D. E., and D. Richter: Biochem. J. (Brit.) **31**, 596 (1937). — [18] Marquardt, P.: Schweiz. med. Wschr. **1940 I**, 36. — Z. exper. Med. **109**, 468 (1941). — [19] Michejew, N. A.: J. Physiol. (USSR.) **22**, 119 (1937). — [20] Burns, D., and J. Secker: J. Physiol. (Brit.) **88**, 2 (1936). — [21] Van der Hoof, D. and C. Haskell: Amer. J. med. Sci. **166**, 119 (1923). — [22] Pfeiffer, P.: Organische Molekülverbindungen. Stuttgart: Ferdinand Enke 1927. — [23] Vincke, E.: Darstellung von Hormonpräparaten. Leipzig: S. Hirzel 1945. — [24] Boeseken, J.: Ber. dtsch. chem. Ges. **46**, 2612 (1913). — [25] Hermans, P. H.: Z. anorg. u. allg. Chem. **142**, 83 (1925). — [26] Schaefer, H.: Z. anorg. u. allg. Chem. **247**, 96 (1941); **250**, 82, 127 (1942). — [27] Zipf, H. F., u. G. Stephan: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 55 (1949). — [28] Marquardt, P.: Pharmazie **1946**, 13. — [29] Marquardt, P.: Enzymologia (Nd.) **12**, 166 (1947).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Bonn, Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 547—568 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Farbenfabriken „Bayer", Wuppertal-Elberfeld.

Zur Pharmakologie der Phosphorsäureester.

Diäthyl-p-nitrophenylphosphat („Mintacol").

Von

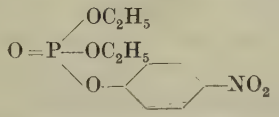
WOLFGANG WIRTH.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1949.)

Der nach dem Kriege eingetretene Mangel an Eserin war die Veranlassung, eine in der letzten Zeit neu erschlossene Körperklasse auf ihre Verwendungsmöglichkeit als Mioticum und Mittel gegen Glaukom zu durchsuchen. Es handelt sich um Ester der Phosphorsäure, die von G. SCHRADER[1, 2] zunächst unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel synthetisiert worden waren und von denen Präparate unter der Bezeichnung Bladan und E 605 als Pflanzenschutzmittel in den Handel gekommen sind. Bei den synthetischen Arbeiten beobachtete G. SCHRADER[3] (1937) an sich selbst neben leichter Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens Sehstörungen infolge Pupillenverengung. Dies war der Anlaß zu den ersten pharmakologischen Untersuchungen dieser Stoffgruppe durch E. GROSS, W. WIRTH, J. SEXTL (1937), L. LENDLE, W. KOLL (1939). In USA. wurde als Mioticum und als Mittel zur Glaukombehandlung das Diisopropylfluorphosphat* (DFP) von LEOPOLD und COMROE[6] eingeführt, das auch zur Behandlung postoperativer Darmlähmungen und der Myasthenia gravis vorgeschlagen ist. Dieser Stoff wurde erstmalig von G. SCHRADER[4] (1939) und unabhängig davon von MCCOMBIE und SAUNDERS[7] (1941) in England synthetisiert. Die Verbindung kann nur in öliger Lösung klinische Anwendung finden, da die wäßrigen Lösungen schon nach 16 Std zur Hälfte hydrolysiert sind.

In Deutschland ist in der Nachkriegszeit das von G. SCHRADER[2] synthetisierte Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (Mintacol, früher E 600 bezeichnet)



von G. HECHT auf Grund einer ersten Prüfung für den genannten Zweck vorgesehen worden.

* Bereits LANGE und v. KRUEGER[5] (1932) hatten bei chemischen Arbeiten mit Dimethylfluorphosphat und Diäthylfluorphosphat Störungen an den Augen beobachtet, sie aber wohl nicht richtig gedeutet.

Mintacol (M.) ist eine gelbbraun gefärbte Flüssigkeit von geringer Flüchtigkeit, Kochpunkt bei 2 mm etwa 178°. Spezifisches Gewicht bei 20° C 1,273. Die Verbindung ist in organischen Lösungsmitteln leicht, in Wasser bei Zimmertemperatur zu 0,1% löslich. Die wäßrige Lösung ist stabil und bei einem p_H-Wert unterhalb 6 farblos, bei einem p_H-Wert oberhalb 6 grünlich-gelb gefärbt. In alkalischem Milieu findet rasch Verseifung statt.

Über pharmakologische Untersuchungen dieses Stoffes wird in dieser Arbeit berichtet.

A. Örtliche Wirkungen.

a) Wirkung auf das Auge.

Hier stand die Prüfung der pupillenverengernden Wirkung im Vordergrund. Zu ihrer Prüfung wurde in erster Linie die Katze, in geringerem Umfange das Kaninchen herangezogen.

In Tabelle 1 werden die Befunde angegeben, die sich bei Einträufeln von 50 mm^3 der angegebenen Verdünnung in destilliertem Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung ergaben. Jede Verdünnung wurde an mehreren Versuchstieren geprüft; die in der Tabelle 1 angegebenen Wirkungen sind die durchschnittlichen Befunde.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß noch bei Verdünnung 1:6000, das entspricht absolut 0,0083 mg M., die Pupille des Katzenauges für mehrere Stunden sehr stark bis maximal kontrahiert wird, und daß auch noch 24 Std nach dem Einträufeln eine leichte Verengung nachweisbar war. Die meisten Tiere zeigten bei dieser Verdünnung nach 2 Tagen wieder normale Pupillenweite und normale Pupillenreaktionen. Besonders bei Verwendung stärkerer Konzentrationen von M. wurden auch Tiere beobachtet, die längere Zeit bis mehrere Wochen andeutungsweise verengte Pupillen bei sonst normalen Pupillenreaktionen aufwiesen.

Vergleichsversuche mit Eserin (Physostigmin. sulf.) ergaben, daß M. am Katzenauge stärker wirksam ist, mindestens um das 5—10fache. M. ist auch rascher und länger wirksam als Eserin. So erwies sich eine M.-Konzentration 1:6000 stärker als Eserin 1:1000, wenn auch die Eserinwirkung *vorübergehend* diejenige von M. übertreffen kann. Bei einer Katze, der M. 1:6000 in das eine Auge und Eserin 1:1000 in das andere Auge eingeträufelt worden war, trat z. B. die Pupillenverengerung am M.-Auge zunächst stärker ein, etwa 1 Std nach dem Einträufeln drehte sich für kurze Zeit dieses Verhältnis um, das Eserinauge war stärker verengt (Maximum der Eserinwirkung), nach einer weiteren Stunde und in der Folgezeit trat die Eserinwirkung zurück und die M.-Wirkung wieder in den Vordergrund.

Tabelle 1. *Wirkung von Mipafox am Auge von Katze und Kaninchen.*

Verdünnung	Versuchstier	Eintritt der Wirkung	Höhepunkt der Wirkung	Abklingen der Wirkung	Örtliche Reizerscheinungen
1:500	Katze	Nach 10 min Pupille deutlich verengt.	Ab 15 min bis 4—5 Std Pupille maximal verengt, im Dunkeln keine Öffnung.	Nach 6 Std noch stark verengt. Nach 24 Std noch leicht verengt. Nach 2—3 Tagen meist normal. Vielfach wochenlang andeutungsweise enger.	keine
1:500	Kaninchen	Nach 5—10 min Pupille stark verengt.	Ab 15 min bis 8 Std Pupille maximal verengt, im Dunkeln keine Öffnung.	Nach 24—48 Std noch deutlich verengt. Nach 3 Tagen meist normal.	Deutlich Rötung der Augenbindehaut und Sklera, nach 1 Tag wieder normal.
1:1000	Katze	Nach $^1/_4$ Std Pupille deutlich verengt.	Ab 30 min bis 3 Std Pupille maximal verengt, öffnet sich nicht im Dunkeln.	Nach 6 Std noch stark verengt, im Dunkeln wieder leichte Öffnung, nach 24 Std oft noch leicht verengt, nach 2 Tagen normal oder in Folgezeit noch andeutungsweise Verengerung.	keine
1:1000	Kaninchen	Nach $^1/_4$ Std Pupille deutlich verengt.	Nach $^1/_2$—3 Std Pupille sehr stark verengt.	Nach 5 Std noch stark verengt, nach 1—2 Tagen meist wieder normal.	Flüchtige, geringfügige Rötung der Augenbindehaut.
1:6000	Katze	Nach $^1/_2$ Std Pupille deutlich verengt.	Nach 1—3 Std sehr stark bis maximal verengt, im Dunkeln nur geringe Erweiterung.	Nach 5 Std noch deutlich verengt, nach 24 Std vielfach noch leicht bis angedeutet verengt, nach 1—2 Tagen wieder normal, gelegentlich auch in Folgezeit noch andeutungsweise enger als Kontrollauge.	keine
1:10000	Katze	Nach $^1/_2$ Std deutlich verengt.	Nach 1—3 Std stark verengt, im Dunkeln teilweise Erweiterung.	Nach 6 Std noch deutlich verengt, nach 24 Std noch leicht bis angedeutet verengt oder normal.	keine
1:20000	Katze	Nach 1 Std schwach verengt.	Nach $1^1/_2$—4 Std deutlich enger als am Kontrollauge.	Nach 5 Std noch schwach verengt, nach 24 Std meist normal, gelegentlich andeutungsweise verengt.	keine
1:40000	Katze	Nach 1 Std schwach verengt.	Nach 2—3 Std deutlich enger als am Kontrollauge.	Nach 5 Std andeutungsweise bis schwach verengt, nach 24 Std normal, gelegentlich noch andeutungsweise verengt.	keine
1:100000	Katze	Nach 1 Std andeutungsweise verengt.	Nach 1—3 Std andeutungsweise verengt.	Nach 5 Std noch andeutungsweise verengt. Nach 24 Std normal.	keine
1:200000	Katze	Keine Wirkung.	Keine Wirkung	Keine Wirkung.	keine

In dieser Tabelle bedeutet: Maximale Verengung: Pupille völlig geschlossen (strichförmig). Starke Verengung: Pupille etwa $^3/_4$ geschlossen bezogen auf das Kontrollauge. Deutliche Verengung: Pupille etwa $^1/_2$ geschlossen bezogen auf das Kontrollauge. Leichte Verengung: Pupille etwa $^1/_4$ geschlossen bezogen auf das Kontrollauge. Schwache Verengung: Pupille weniger als $^1/_4$ geschlossen bezogen auf das Kontrollauge.

Die Grenze der Empfindlichkeit des Katzenauges für M. liegt unter den gewählten Versuchsbedingungen bei etwa 1:100000, einer Konzentration, bei der andeutungsweise aber einwandfrei nachweisbar für mehrere Stunden Pupillenverengerung auftrat. Dieser Grenzkonzentration entspricht eine absolute eingeträufelte M.-Menge von 0,5 γ. Die Empfindlichkeitsgrenze für Eserin am Katzenauge wird von Führner[8] dagegen bei 2 γ angegeben.

Die pupillenverengernde Wirkung von M. wird durch Atropin wieder aufgehoben. Einmalige Anwendung von Atropin 1:100 hob z. B. die Wirkung von M. in Verdünnung 1:1000 auf, so daß am nächsten Tag die Pupillen wieder normale Weite und normale Reaktionen aufwiesen. Wurde Atropin 1:100 nach M. 1:6000 angewandt, so brach die Atropinwirkung meist voll durch. Umgekehrt kann auch die Atropinwirkung am Katzenauge durch geeignete Konzentrationen von M. wieder rückgängig gemacht werden. M. und Atropin sind am Auge demnach Antagonisten in gleicher Weise, wie das für Eserin bekannt ist.

Die pupillenverengernde Wirkung von M. wurde nur bei örtlicher Einwirkung am Auge festgestellt. Sie fehlte dagegen bei Einspritzung des Präparates oder bei peroraler Zuführung auch bei toxischen Dosen.

Die wäßrigen Lösungen von M., eingestellt auf ein p_H von 6,8, behielten beim Aufbewahren über mehr als 1 Jahr am Katzenauge ihre volle Wirksamkeit.

M. in öliger Lösung in das Auge eingebracht, ergibt abgeschwächte aber etwas verlängerte Wirkung. Bei einer Katze wurde z. B. durch eine Verdünnung 1:5000 in Olivenöl nach etwa 1 Std die Pupille deutlich verengt, nach 3 Std war mit ziemlich starker Verengung der Höhepunkt der Wirkung erreicht. Dieses Stadium hielt etwa 6 Std an, und auch nach 24 Std war ein Rest der Pupillenwirkung deutlich nachweisbar ebenso meist nach 48 Std andeutungsweise. Hinsichtlich der Wirkungsstärke entspricht eine Öllösung 1:5000 einer wäßrigen Lösung von etwa 1:10000. Die Wirkungsdauer der Öllösung betrug vielfach das $1^1/_2$fache oder das Doppelte der Wirkungsdauer der wäßrigen Lösung.

Wiederholte Einträufelung einer Lösung 1:6000 bei ein und derselben Katze ergab auch nach 17maliger täglicher Instillation keine Änderung in dem Ausmaß der Pupillenreaktion. Das gleiche galt bei täglich wiederholter Einträufelung einer Lösung 1:1000 an 5 aufeinanderfolgenden Tagen am Auge von Hund, Katze und Kaninchen. Es besteht also kein Anhalt für eine kumulative Wirkung des Präparates an der Pupille.

b) Örtliche Reizwirkung.

Bei der oben erwähnten, wochenlang täglich wiederholten Einträufelung wäßriger Lösungen 1:6000 in das Katzenauge wurde keine

Reizwirkung an den Schleimhäuten des Auges und der Cornea beobachtet. Auch bei der täglich wiederholten Instillation der wäßrigen Lösung 1:1000 in das Auge von Hund und Katze kamen weder akute Reizwirkungen noch nachträgliche Entzündungsreaktionen oder Gewebsschädigungen vor. Lediglich das Kaninchen zeigte im Anschluß an die Einträufelung einen leichten Reizzustand der Augenbindehaut, der rasch ohne nachträgliche Wirkungen wieder abklang.

An gewaschenen roten Blutkörperchen vom Pferd bewirkte M. bis zur Sättigung 1:1000 weder Hämolyse noch Verfärbung.

Bei intrakutaner Einspritzung von 0,1 cm^3 der Lösungen $1:10^4$ und $1:10^3$ am Kaninchenohr blieben örtliche Reizwirkungen aus.

Es ergibt sich demnach, daß M. praktisch keine örtliche Reizwirkung auf die Gewebe besitzt.

B. Resorptive Wirkung und Toxizität.

a) Wirkungsbild und toxische Dosen.

Für Paramäzien war M. von geringer Wirkung. Bei der gewählten Beobachtungszeit von 2 Std blieb $1:10^4$ ohne erkennbare Einwirkung, erst bei $1:5 \cdot 10^3$ starben innerhalb dieser Zeit die Tiere ab.

Zur Festlegung des Wirkungsbildes und der Toxizität wurden Versuche am Frosch, der weißen Maus, Meerschweinchen, Kaninchen und Katze durchgeführt. Zugleich wurden einige Versuche mit Physostigmin zum Vergleich angestellt.

1. Versuche am Frosch. Nach Einverleibung von 60—100 mg M. je Kilogramm Tiergewicht in den Lymphsack von Eskulenten wird das Tier bewegungsarm, es kommt zu zunehmender Lähmung, die Atmung wird seltener und hört schließlich völlig auf. Zuletzt erlöscht die Herztätigkeit. Bei der Sektion erwiesen sich die Lungen mehr oder weniger gebläht, sonst ergab sich kein besonderer Befund.

Nach 20—30 mg/kg kam es nur zu Lähmung und Rückenlage. Erholung nach 1 Tag. Dosen darunter waren ohne besondere Wirkung.

2. Versuche an der weißen Maus. Nach Einverleibung toxischer Dosen unter die Haut wurden folgende Symptome beobachtet: Unruhe, Schreckhaftigkeit, Schwanken beim Laufen, Steifbeinigkeit, fibrilläre Muskelzuckungen, Atembeschleunigung und Atemnot, Speichelfluß, Augentränen und klonisch-tonische Krämpfe. Die Krämpfe können im Verlauf von mehreren Stunden wiederholt auftreten und sind dann auch mechanisch auslösbar. Tod im akuten Krampfanfall unter allen Zeichen von Atemnot. Spättod (nach 1 Tag und später) ist selten. Erholung ist auch nach schwerstem Krampfzustand möglich.

0,6 mg/kg in wäßriger Lösung subkutan zugeführt waren meist tödlich. Bei der Sektion wurden keine besonderen Organbefunde erhoben.

Bei 0,2 mg/kg waren feine fibrilläre Muskelzuckungen meist das einzige Symptom. Bei 0,1 mg/kg wurden keine Erscheinungen mehr festgestellt.

Da M. bei intravenöser Zufuhr etwa gleichwirksam ist wie bei subkutaner Einverleibung, folgt, daß der Stoff vom Unterhautzellgewebe rasch resorbiert wird. Demgegenüber tritt bei der Anwendung von Öllösungen zur subkutanen Einverleibung anscheinend eine erhebliche Verzögerung der Resorption ein, die letale Dosis liegt hier bei 2 mg/kg. Bei peroraler Verabreichung von Öllösungen ist die Resorption anscheinend besonders unvollkommen, denn 10 mg/kg werden hier ohne Symptome vertragen, erst 20 mg/kg wirken tödlich. Vergleichsversuche mit Physostigmin. sulf. an Mäusen ergaben etwa dasselbe Wirkungsbild wie mit M.

3. Versuche am Meerschweinchen. Beim Meerschweinchen standen fibrilläre Muskelzuckungen, Bewegungsarmut, Gleichgewichtsstörungen, Vermehrung der Speichelsekretion, des Kot- und Urinabganges, Augentränen, Beschleunigung der Atmung und asthmaartige Atemnot im Vordergrund des Symptomenbildes. Krämpfe wurden nicht beobachtet. Der Tod erfolgte unter allen Zeichen von Atemnot. Die Sektion ergab auch hier keinen besonderen Befund.

Bei subkutaner Zufuhr toxischer oder letaler Dosen traten die ersten Vergiftungssymptome erst nach einer Latenzzeit von $^1/_2$—1 Std auf, während bei der Maus letale Dosen meist innerhalb von Minuten wirksam werden. Nach 0,5 mg/kg Tiergewicht tritt der Tod nach etwa 3—4 Std ein, nach 0,3—0,4 mg/kg kam es zu stundenlang andauerndem Muskelzittern und geringer Ataxie. 0,1 mg/kg war ohne sichtbare Wirkung. Bei subkutaner Einverleibung von Öllösungen lagen die toxischen bzw. letalen Dosen etwa um die Hälfte höher.

4. Versuche am Kaninchen. Beim Kaninchen wurden die gleichen Symptome wie beim Meerschweinchen beobachtet, jedoch zeigten die Tiere stärkere Unruhe und Bewegungsdrang, Schreckhaftigkeit, nach hohen toxischen Dosen klonisch-tonische Krampfanfälle. Die Pupillen blieben immer mittelweit.

0,4 mg/kg subkutan war nach etwa $2^1/_2$ Std tödlich. 0,2 mg/kg verursachte etwa 2 Std lang fibrilläre Muskelzuckungen, 0,1 mg/kg war ohne Wirkung; auch der Blutzucker blieb unverändert.

Intravenös zugeführt war 0,3 mg/kg in weniger als $^1/_2$ Std tödlich. 0,2 mg/kg führte zu starker Intoxikation mit Krampfanfall aber nachfolgender völliger Erholung. 0,1 mg/kg hatte leichte Vergiftungserscheinungen — Unruhe, Defäkation und Muskelzittern — zur Folge. 0,06 mg/kg und darunter blieb ohne sichtbare Symptome. Bei der Sektion ergab sich kein besonderer Organbefund, das Herz war schlaff und mit Blut gefüllt.

Physostigmin. sulf. ergab praktisch dieselben Symptome, jedoch ist es am Kaninchen weniger toxisch: 0,3—0,4 mg/kg intravenös erzeugte klonisch-tonische Krämpfe, aber die Erscheinungen gingen nach 1 Std völlig zurück.

5. Versuche an der Katze. Bei subkutaner Zufuhr von 0,3 mg/kg kam es nur zu geringfügigen Muskelzuckungen. Nochmalige Injektion der gleichen Menge nach 4 Std führte nach 10 min zu starker Unruhe, Bewegungsdrang, Speicheln, Taumeln, Brechreiz, heftiger Defäkation und Blasenentleerung, Steifbeinigkeit, zunächst Atembeschleunigung, dann zu starker Atemnot von asthmatischem Charakter. Die Erscheinungen steigerten sich zunehmend und es kam innerhalb von 20 min zu klonisch-tonischen Krämpfen. Durch Verabreichung von Atropin (3 mg/kg subkutan 2mal innerhalb von 10 min) wurden die bedrohlichen Symptome stark gemildert, und das Tier überlebte. Die Dosis letalis für die Katze liegt bei 0,7—0,8 mg/kg subkutan. 0,1 mg/kg wurde dagegen auch bei täglicher Zufuhr an 12 aufeinander folgenden Tagen symptomlos vertragen: Allgemeinbefinden, Freßlust, Harnbefund, Hämoglobin, Zahl der roten und weißen Blutzellen blieben normal, Methämoglobin trat nicht auf, die Heinzkörperchen waren nicht vermehrt.

Physostigmin. sulf. subkutan ergab schon bei einmaliger Einverleibung von 0,3 mg/kg Erregung, Bewegungsdrang, Muskelzuckungen, Steifbeinigkeit, Atembeschleunigung, dann Atemnot, Speichelfluß, Defäkation und Andeutung von Krämpfen. Nochmalige Injektion der gleichen Menge nach 4 Std steigerte diese Symptome nicht mehr wesentlich, das Tier überlebte. 0,1 mg/kg wurde ohne sichtbare Erscheinungen vertragen.

In Tabelle 2 sind die ermittelten Dosen für M. zusammengestellt. Zum Vergleich sind diejenigen für Physostigmin angefügt. Aus den Versuchen bzw. der Tabelle geht hervor:

1. Bei parenteraler Zufuhr von M. in wäßriger Lösung liegen für Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze sowohl die Dosis tolerata als auch die Dosis toxica und Dosis letalis jeweils etwa in gleicher Höhe und zwar die Dosis tolerata um 0,1 mg/kg, die Dosis toxica um 0,2 bis 0,3 mg/kg, die Dosis letalis um 0,4—0,8 mg/kg.

2. Peroral in Öllösung zugeführt hat M. nur etwa $^1/_{10}$ der toxischen Wirkung der parenteralen Zufuhr in Öllösung.

3. Am Frosch besitzt M. etwa $^1/_{100}$ der Toxizität, die an den genannten Warmblütern festgestellt war.

4. Für die Maus ist M. subkutan zugeführt von gleicher, intravenös von etwas geringerer Toxizität als Physostigmin. Für Kaninchen, Katze und Frosch ist Physostigmin weniger toxisch als M.

Das Symptomenbild bei toxischen Dosen entsprach bei M. weitgehend demjenigen bei Physostigmin. sulf., wenn auch in der Stärke der einzelnen Symptome vielfach Abweichungen zwischen den beiden

Tabelle 2. *Toxische und letale Dosen von Mintacol und Physostigmin.*

Tierart	Applikation	Mintacol mg/kg			Zum Vergleich Physostigmin. sulf. mg/kg		
		Dosis tolerata	Dosis toxica	Dosis letalis	Dosis tolerata	Dosis toxica	Dosis letalis
Frosch	subkutan (wäßrige Lösung)	10	20	60	100	500	1000
Maus	subkutan (wäßrige Lösung)	0,1	0,25	0,6	<0,2	0,2	0,6—0,8
	subkutan (Öllösung)	1,0		2,0			
	peroral (Öllösung)	10		20			
	intravenös (wäßrige Lösung)	0,1	0,3	0,5—0,7	<0,1	0,2	0,4
Meerschweinchen	subkutan (wäßrige Lösung)	0,1	0,3—0,4	0,5			
	subkutan (Öllösung)		0,5	0,75			
Kaninchen	subkutan (wäßrige Lösung)	0,1	0,2	0,4			> 2 mg *
	intravenös (wäßrige Lösung)	0,06	0,1	0,3		0,3—0,4	
Katze	subkutan (wäßrige Lösung)	0,1	0,3—0,6	0,7—0,8	0,1	0,3—0,9	

* Nach FLURY und ZERNIK [9].

Stoffen bestanden. Bei beiden Stoffen werden typisch vegetative Symptome beobachtet. Besonders charakteristisch ist für beide Stoffe das Auftreten oft stundenlang anhaltender fibrillärer Muskelzuckungen. Bei Kaninchen und mehr bei der Katze kam es weiterhin zu Erregungszuständen bis zu vorwiegend klonischen Krämpfen sowohl durch M. als auch durch Physostigmin. Am Frosch wurde durch M. und durch Physostigmin dagegen nur Lähmung hervorgerufen.

b) Antagonismus zu Atropin.

Da ein wesentlicher Teil der Symptome nach Gaben von M. oder Physostigmin als Folge parasympathischer Erregung aufzufassen ist, wurde an weißen Mäusen Atropin. sulf. in einer Versuchsreihe gleichzeitig mit M., in einer weiteren Reihe $^1/_2$ Std vorher subkutan injiziert (Tabelle 3).

Es zeigte sich, daß bei gleichzeitiger Verabreichung von 1 mg/kg Atropin die einfache letale Dosis von M. (0,6 mg/kg) überlebt wird, auch bei der $1^1/_2$fachen letalen Dosis ist noch eine Schutzwirkung zu erkennen. Wird Atropin $^1/_2$ Std vor M. einverleibt, so nimmt die Schutzwirkung zu, es wurde dann die $1^1/_2$fache letale Dosis von M. (0,8 mg/kg) sicher überlebt. Bei Steigerung der Atropinmenge auf das

Tabelle 3. *Versuche über die antagonistische Wirkung von Mintacol und Atropin an weißen Mäusen* (beides subkutan).

Mintacol mg/kg	Atropin mg/kg	Befund tot	Befund überlebt	Mintacol mg/kg	Atropin mg/kg	Befund tot	Befund überlebt
0,6	—	10	0	b) $^1/_2$ Stunde vorher.			
a) gleichzeitig.				0,6	1,0	0	3
				0,8	1,0	0	3
0,6	1,0	0	3	1,0	1,0	2	1
0,8	1,0	1	2	1,2	1,0	3	0
1,0	1,0	3	0	1,2	5,0	2	1
1,0	5,0	2	1	1,8	5,0	3	0
1,2	5,0	3	0				

Tabelle 4. *Versuche an weißen Mäusen zur Eliminierung von Mintacol.*

Versuch Nr.	Mintacol Einzeldosis mg/kg	Zahl der Verabreichungen	Zeitabstand zwischen den Einzeldosen Std	Einverleibte Gesamtmenge mg/kg	Befund
1	0,1 ($^1/_6$ akut tödl. Dos.)	3mal	24	0,3 ($^1/_2$ akut tödl. Dos.)	2 Tiere überleben, keine Symptome
2	0,1	24mal	24	2,4	2 Tiere überleben, keine Symptome
3	0,2	18mal	24	3,6	4 Tiere überleben, leichte Muskelzuckungen. 1 Tier tot nach 12., 2 Tiere tot nach 15. Injektion
4	0,3	2mal	6	0,6 (1fach akut tödl. Dos.)	3 Tiere überleben, starke Muskelzuckungen
5	0,3	2mal	5	0,6	2 Tiere überleben, starke Muskelzuckungen, 1 Tier tot
6	0,3	2mal	4	0,6	2 Tiere überleben, starke Muskelzuckungen, 1 Tier tot
7	0,3	2mal	3	0,6	2 Tiere überleben, starke Muskelzuckungen, 1 Tier tot
8	0,3	2mal	2	0,6	1 Tier überlebt, starke Muskelzuckungen, 2 Tiere tot
9	0,3	2mal	1	0,6	1 Tier überlebt, starke Muskelzuckungen, 2 Tiere tot
10	0,2	4mal	2	0,8	1 Tier überlebt, starke Muskelzuckungen, 2 Tiere tot
11	0,15	5mal	2	0,75	5 Tiere überleben. Nach 1. und 2. Injektion o. B., nach 3. Injektion fibrilläre Muskelzuckungen, nach 4. Injektion deutliche Muskelzuckungen. Nach 5. Injektion heftige Muskelzuckungen
12	0,1	6mal	2	0,6	3 Tiere überleben. Von 4. Injektion an etwas matt, sonst o. B.

5fache war noch eine gewisse Verbesserung der Schutzwirkung erreichbar. Die überlebenden Tiere zeigten die Krampfwirkungen weniger stark

ausgeprägt, als sie sonst auftraten. Am folgenden Tag waren diese Tiere durchweg völlig erholt. Spätwirkungen sind nicht beobachtet worden.

Nach Versuchen von G. Hecht ist Atropin auch beim Meerschweinchen wirksam. Bei gleichzeitiger Verabreichung von 50 mg Atropin. sulf. je Kilogramm Tier wurde fast die 3fach tödliche Dosis M. von den Tieren ertragen, es kam dann nur noch zu feinem Zittern und geringen Gleichgewichtsstörungen.

c) Versuche zur Eliminierung.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß auch bei wochenlang fortgesetzter täglicher Zufuhr von 0,1 mg/kg M., entsprechend $^1/_6$ der akut tödlichen Dosis, keine Vergiftungssymptome auftreten. Auch 0,2 mg/kg, entsprechend $^1/_3$ der akut tödlichen Dosis, wird bei wochenlang täglicher Zufuhr weitgehend eliminiert. Wird die einfach akut tödliche Dosis in 2 Einzeldosen von 0,3 mg/kg mit einer Pause von 6 Std verabreicht, so findet soweit Eliminierung statt, daß die Tiere trotz Muskelkrämpfe überleben. Beträgt die Pause zwischen den Einzeldosen geringere Zeit, so ist die Eliminierung nicht mehr so weitgehend, daß alle Tiere überleben, immerhin ist bei einer Pause von nur 1 Std eine gewisse Eliminierung noch erkennbar. Die Dosis, die die Maus innerhalb 2 Std eliminieren kann, liegt etwa bei 0,1 mg/kg, wie aus Versuch Nr. 12 hervorgeht.

C. Einwirkung auf die Cholinesterase.

Die Parallelen, die andere Vertreter dieser Körperklasse im Wirkungsbild mit Eserin aufwiesen, waren bereits gelegentlich der eingangs genannten pharmakologischen Untersuchungen die Veranlassung zu prüfen, ob in analoger Weise wie bei Eserin eine Beeinflussung der Cholinesterase vorliegt. H. Gremels (1940/41, aus dem Pharmakologischen Institut der Militärärztlichen Akademie, unveröffentlicht) stellte in diesem Zusammenhang im Blutdruckversuch bei der Katze an der Sensibilisierung der Azetylcholinwirkung erstmalig fest, daß wie bei Eserin durch diese Körperklasse die Cholinesterase stark gehemmt wird. Zu gleichem Ergebnis kam später E. Gross am Blutegel. Von Adrian, Feldberg und Kilby[10] (1947) ist über Untersuchungen der Kriegszeit (1941) über organische Phosphorverbindungen berichtet worden, die in hohem Grade die Cholinesterase hemmen. Es handelt sich um die eingangs bereits genannten Dialkylfluorphosphate, darunter DFP. Weiterhin wiesen Dubois und Mangun[11] (1947) eine sehr starke Hemmung der Cholinesterase durch Hexaäthyltetraphosphat und Tetraäthylpyrophosphat nach, Verbindungen, die von G. Schrader[1] als Insektizide entwickelt worden sind.

Im Hinblick auf die große Ähnlichkeit im Wirkungsbild mit Eserin wurde daher in vorliegender Arbeit bei M. geprüft, inwieweit es die Cholinesterase hemmt.

Die Untersuchung wurde nach der manometrischen Methode von R. Ammon[12] mit der Warburg-Apparatur durchgeführt. In den Hauptteil des Warburg-Troges wurden 1,5 cm³ 0,5%ige Azetylcholinchloridlösung = 7,5 mg Azetylcholinchlorid eingebracht. Der Anhangteil des Troges konnte nur 0,3 cm³ der Ferment-

und Hemmkörperlösung aufnehmen. Für alle Lösungen wurde Ringer (30) benützt. Nach Einkippen des Inhalts des Anhangteiles betrug demnach das Gesamtflüssigkeitsvolumen $v_F = 1{,}8\ cm^3$. Versuchstemperatur 37,5° C. Gasphase 5% Kohlensäure in Stickstoff.

Als Fermentpräparat diente Pferdeserum, das nach MACKWORTH und WEBB[14] gegenüber Alkylphosphaten gleich empfindliche Komponenten an „wahrer" und „Pseudo"-Cholinsterase enthalten soll. Im Einklang mit dem Hinweis von AMMON[13] zeigte sich, daß die Blutseren verschiedener Pferde in ihren Aktivitäts- bzw. Hemmungswerten Abweichungen ergeben können. Es wurde daher nach

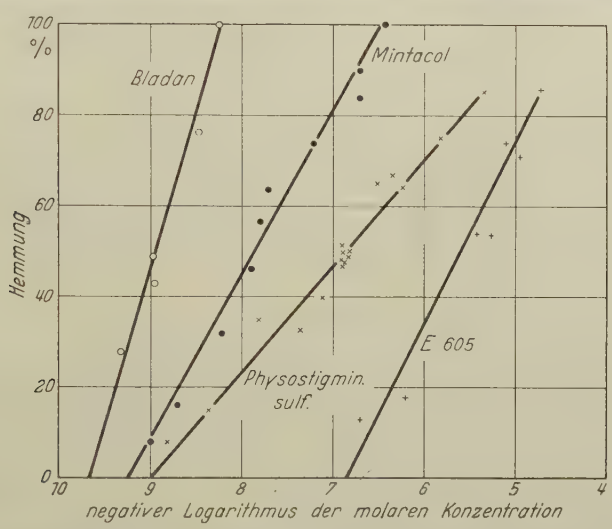


Abb. 1. Abhängigkeit der Hemmung der Cholinesterase des Pferdeserums von der molaren Konzentration (negativer Logarithmus) von Bladan, Mintacol, Physostigmin, E 605.

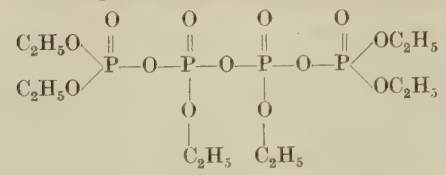
Möglichkeit ein und dieselbe Pferdeserumprobe zur Durchführung einer zusammenhängenden Versuchsreihe verwendet.

In Abb. 1 sind die Versuche graphisch dargestellt. Auf der Ordinate wird die Hemmung der Cholinesterase des Pferdeserums in Prozent der normalen Aktivität angegeben, auf der Abszisse der negative Logarithmus der molaren Konzentration der untersuchten Körper.

Die Versuche ergaben, daß bereits bei einer molaren Konzentration von 10^{-9} M., entsprechend $1/2000\,\gamma$ absolute Stoffmenge in $1{,}8\ cm^3$ Flüssigkeit des Warburg-Troges, der Beginn einer Hemmung der Serum-Cholinesterase deutlich nachweisbar ist. Zu 50% ihres Normalwertes wird die Cholinesterase durch $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ molar M. gehemmt, entsprechend $0{,}0065\,\gamma$ absolut im Warburg-Trog bzw. $0{,}0036\,\gamma/1\ cm^3$.

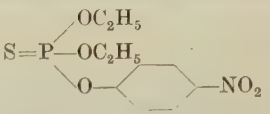
Zum Vergleich war eine entsprechende Versuchsreihe mit Physostigmin. sulf. durchgeführt worden und weiterhin mit den von G. SCHRADER[1] entwickelten Insektiziden:

Tetraphosphorsäurehexaäthylester – „Bladan" von der Formel:



Zersetzung bei etwa 160° C.

Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat = E 605 von der Formel:



Kochpunkt 180° C bei 2 mm.

E 605 unterscheidet sich demnach von M. durch Austausch des am Phosphor doppelt gebundenen Sauerstoffs durch Schwefel.

In Tabelle 5 sind die hier gefundenen molaren Konzentrationen und die absoluten Mengen, die zu 50%iger Hemmung der Cholinesterase des Pferdeserums führen, für die genannten Stoffe angegeben.

Tabelle 5.

Stoff	Molare Konzentration für 50%ige Hemmung	Negativer Logarithmus der molaren Konzentration für 50%ige Hemmung	Absolute Menge in 1cm³ für 50%ige Hemmung γ
Tetraphosphorsäurehexaäthylester (Bladan)	$1{,}2 \cdot 10^{-9}$	8,94	0,00061
Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (Mintacol)	$1{,}3 \cdot 10^{-8}$	7,89	0,0036
Physostigmin. sulf.*	$1{,}2 \cdot 10^{-7}$	6,92	0,044
Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat (E 605)	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	5,60	0,73

* R. AMMON[13] erhielt 50%ige Hemmung von Pferdeserumcholinesterase durch 0,038 γ Physostigmin. sulf. in $v_F = 2$ cm³, also durch 0,019 γ/1 cm³.

Bezogen auf molare Konzentrationen hemmt demnach M. die Cholinesterase des Pferdeserums 10mal stärker als Physostigmin. sulf. und fast 200mal stärker als E 605. M. gehört demnach zu den stärksten bisher bekannt gewordenen Hemmkörpern der Cholinesterase, es wird in dieser Hinsicht nur von wenigen Stoffen übertroffen, z. B. von Bladan, das um eine Zehnerpotenz wirksamer ist. Das gilt auch für DFP mit 50%iger Hemmung der Cholinesterase aus Pferdeserum durch $1{,}3 \cdot 10^{-9}$ molar bei 20°, nach MACKWORTH und WEBB[14].

D. Wirkung auf isolierte Organe.

Zur weiteren Klärung der Wirkungsweise von M. wurde eine Reihe von Versuchen an isolierten Organen ausgeführt.

a) Kreislaufwirkung.

1. Wirkung am isolierten Froschherzen. Die Versuche wurden an Gras- und Wasserfröschen nach W. Straub vorgenommen.

Bei Temporarien (Mai/Juni, Zimmertemperatur) war $1:10^6$—$1:10^5$ ohne besondere Wirkung. $1:10^4$ führte rasch zur Verminderung der Kontraktionshöhe, zur Verlangsamung der Schlagfrequenz und zu diastolischem Stillstand bei mäßig dilatierten Vorhöfen. Bei Eskulenten (Juni/Juli, Zimmertemperatur) trat vielfach schon bei $1:5 \cdot 10^4$ leichte Verminderung der Schlaghöhe vielfach unter Erhebung des Fußpunktes auf. Bei $1:10^4$ wurde dies deutlicher, schließlich bewirkte $1:5 \cdot 10^3$—$1:3 \cdot 10^3$ Verlangsamung der Frequenz und Stillstand in Diastole. Die negative Inotropie ist leicht mit Ringer auswaschbar, meist auch der Herzstillstand, wenn die Herzkontraktionen oft auch erst längere Zeit (Stunden) nach Auswaschen wieder einsetzen.

Atropin bis $1:10^5$ hatte keinen Einfluß auf die hemmenden Wirkungen von M. weder bei vorheriger, gleichzeitiger oder nachfolgender Zufuhr.

An Froschherzen, deren Empfindlichkeit für Acetylcholin vorher ermittelt war, wurde durch 20 min lange Einwirkung der an sich unwirksamen M.-Lösung $1:10^5$ (mehrfaches Wechseln dieser Lösung in der Froschkanüle) die nachfolgende Reaktion auf Azetylcholin deutlich verstärkt und verlängert. Es liegt also Sensibilisierung für die Azetylcholinwirkung vor, wie sie in ähnlicher Weise bei Physostigmin in den klassischen Versuchen von O. Loewi und E. Navratil[15] nachgewiesen worden ist.

Am isolierten Froschherzen war die Wirkung von M. und Physostigmin weitgehend übereinstimmend. Diastolischer Stillstand wurde aber erst durch 1:500—1:250 Physostigmin hervorgerufen.

2. Wirkung auf den Blutdruck am Hund. An narkotisierten Hunden (75 mg/kg Phanodorm-Natrium intraperitoneal) wurde die Einwirkung von M. auf den Blutdruck in der Carotis blutig gemessen. M. wurde intravenös gegeben.

Dosen bis 0,01 mg M. je Kilogramm Tiergewicht blieben ohne erkennbaren Einfluß auf Blutdruck und Pulsfrequenz, meist auch 0,1 mg/kg. Erst die toxische Dosis 0,3 mg/kg wurde mit leichter, rasch vorübergehender Blutdrucksenkung beantwortet. M. verhielt sich also auch hier ähnlich dem Physostigmin (vgl. Dixon und Ransom[16]).

Intravenöse Verabreichung von 0,01—0,1 mg M. je Kilogramm Hund verursachte bei nachfolgender Einspritzung von Azetylcholin stärkere und längere Blutdrucksenkung, als sie durch die gleiche Azetylcholindosis vor der M.-Einwirkung erfolgte.

Nach diesen Befunden wirkt M. auch am Kreislauf sensibilisierend für Azetylcholin, eine Wirkung, die auf die Hemmung der Cholinesterase zu beziehen ist. Eine unmittelbare Blutdruckwirkung war in nicht-

toxischer Dosis nicht erkennbar, ein Vorteil bei therapeutischer Verwendung des Präparates. Daß der Körperklasse der Phosphorsäureester aber Blutdruckwirkungen generell nicht fehlen, zeigten BURGEN, KEELE, CHENNELS, DEL CASTILLO, FLOYD, SLOME und WRIGHT[17] am Beispiel des Hexaäthyltetraphosphats bei der chloralosierten Katze, wo in sonst nichttoxischer Dosis Bradykardie und Blutdrucksenkung beobachtet wurde.

b) Wirkung auf den Darm.

1. Versuche am isolierten Kaninchendarm nach MAGNUS[18]. Die Versuche wurden an in Tyrodelösung suspendierten Dünndarmstücken von 6 Kaninchen ausgeführt. Die Grenze der Empfindlichkeit des Darms für M. lag bei einer Verdünnung $1:10^9$. Nicht in allen Fällen, aber meistens wurde bereits durch diese Konzentration eine flüchtige Steigerung der Peristaltik oder des Tonus ausgelöst. Mit zunehmender Konzentration nahm diese Wirkung zu. Bei $1:10^8$—$1:10^7$ stand die Steigerung der Peristaltik im Vordergrund. Bei $1:10^6$—$1:10^5$ überwog die Zunahme des Tonus, während die peristaltischen Bewegungen meist zum Erlöschen kamen. Diese Tonussteigerung war anhaltend, durch Auswaschen wurde sie sogleich rückgängig gemacht, konnte dann aber ein zweitesmal am gleichen Darmstück durch die gleiche M.-Konzentration meist nicht nochmals ausgelöst werden. Stärkere Konzentrationen, z. B. $1:10^4$ führten zu Lähmung der Peristaltik zum Teil unter Tonusabnahme.

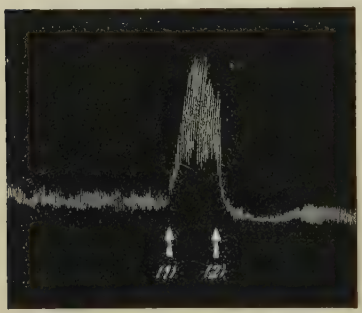


Abb. 2. Antagonismus zwischen Mintacol und Atropin am isolierten Kaninchendarm. Pfeil (1) Mintacol $1:2\cdot10^5$. Pfeil (2) Atropin sulf. $1:10^5$.

Die Empfindlichkeit des isolierten Kaninchendarms für M. ist, wie Vergleichsversuche ergaben, nur wenig schwächer als diejenige für Azetylcholin und Esmodil (N-Trimethyl-2-Methoxy-2,3-propenylammoniumbromid), sie ist stärker als für Physostigmin.

Die durch M. hervorgerufene Steigerung von Peristaltik und Tonus wird durch Atropin prompt rückgängig gemacht (Abb. 2).

Die Azetylcholinempfindlichkeit des isolierten Darmes kann durch Vorbehandlung mit M $1:10^9$ verstärkt werden. Auch dann, wenn die Wirkung von M. in hoher Verdünnung ausbleibt, was gelegentlich beobachtet wurde, wird dennoch die nachfolgende Azetylcholinwirkung fast regelmäßig gesteigert, wie das Kurvenbild Abb. 3 zeigt.

Die Erhöhung der Azetylcholinempfindlichkeit durch M. war im allgemeinen deutlicher ausgeprägt als bei Physostigmin.

2. Versuche am narkotisierten Kaninchen. Am narkotisierten Kaninchen (2,5 g/kg Urethan in 25%iger wäßriger Lösung subkutan) wurde die Tätigkeit des Darmes in situ nach P. TRENDELENBURG[19] registriert. Zugleich wurden der Blutdruck in der Carotis bestimmt und die Atemtätigkeit des tracheotomierten Tieres durch eine MAREY-Kapsel aufgenommen. M. wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst in die Vena femoralis eingespritzt.

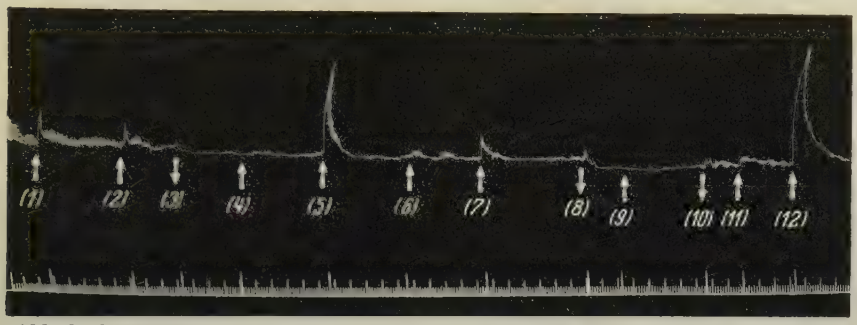


Abb. 3. Sensibilisierung für Azetylcholin durch Mintacol am isolierten Kaninchendarm. Pfeil 1, 2, 5, 7, 12 Azetylcholin $1:10^8$. Pfeil 6, 11 Azetylcholin $1:10^9$. Pfeil 4, 9 Mintacol $1:10^8$. Pfeil 3, 8, 10 Auswaschen mit Tyrodelösung. Zeit: 10 sec.

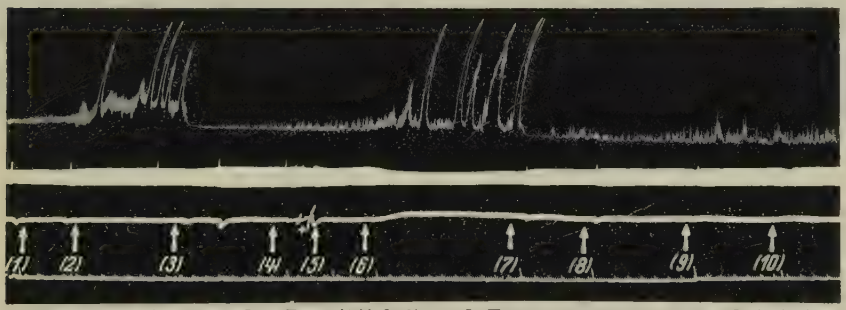


Abb. 4. Registrierung der Darmtätigkeit nach TRENDELENBURG am narkotisierten Kaninchen. Oben Darm, dann Atmung, dann Blutdruck, unten Zeit (10 sec). Mintacol (1): 0,01 mg/kg; (2) und (4): 0,03 mg/kg; (5): 0,06 mg/kg; (6): 0,1 mg/kg. Atropin sulf. (3): 0,5 mg/kg; (7) und (8): 0,25 mg/kg. E 605 (9) und (10): 0,1 mg/kg.

Ein derartiger Versuch ergab (Abb. 4):

0,01 mg/kg M. war ohne besonderen Einfluß auf den Darm, 0,03mg/kg M. führte zu Peristaltikvermehrung und zu kräftiger Tonussteigerung. Durch 1 mg/kg Atropin wurde der Darm wieder beruhigt, es blieb lediglich eine leichte Peristaltik im Gang. Die Atropinwirkung war durch entsprechend höhere M.-Mengen (0,1 mg/kg) wieder rückgängig zu machen. E 605 erwies sich als weniger darmwirksam.

3. Wirkung am Meerschweinchendarm in situ nach W. STRAUB *und* P. VIAUD[20]. Im Versuch Abb. 5 lag der minimale Füllungsdruck vor der M.-Einwirkung bei 100 mm Wassersäule. Durch mehrfache subkutane Einverleibung von M. wurde er auf 80 mm und schließlich auf

60 mm herabgedrückt. Ein mit Atropin stillgelegter Meerschweinchendarm war bei dieser Anordnung durch M. nicht wieder in Funktion zu bringen.

M. ist demnach am Meerschweinchendarm zwar wirksam, aber wesentlich schwächer als am Kaninchendarm, was sich auch in einigen Versuchen am isolierten Darmpräparat nach MAGNUS bestätigte.

c) Wirkung auf den Skeletmuskel.

Zur Prüfung dieser Wirkung wurden Versuche am isolierten Musculus rectus abdominis des Frosches durchgeführt. Es zeigte sich

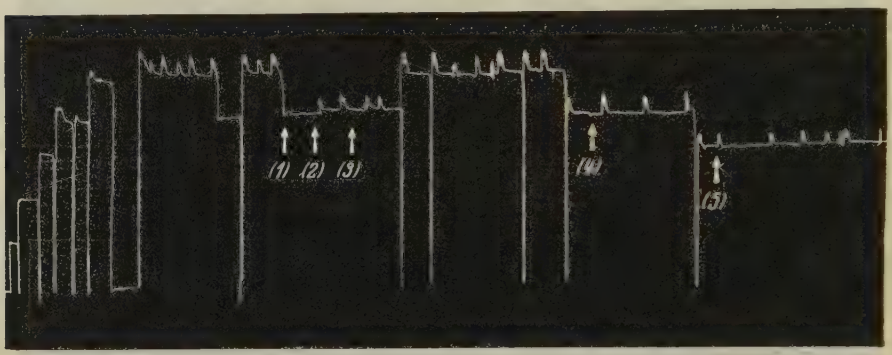


Abb. 5. Ileum in situ nach W. STRAUB und P. VIAUD. Narkotisiertes Meerschweinchen (1 g/kg Urethan intramuskulär). Mintacol subkutan Pfeil (1) 0,001 mg/kg; Pfeil (2) 0,01 mg/kg; Pfeil (3) 0,05 mg/kg; Pfeil (4) 0,1 mg/kg; Pfeil (5) 0,1 mg/kg.

hierbei, daß Konzentrationen von M. bis $1:10^3$, also bis zur Grenze der Löslichkeit des Präparates in Froschringer, keine eigene Wirkung auf den nicht elektrisch gereizten Muskel besitzen.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Azetylcholinwirkung am Froschrektus durch M. beeinflußt wird, ob sich also auch am quergestreiften Muskel eine Wirkung nachweisen ließ, die als Hemmung der Cholinesterase angesehen werden könnte (vgl. R. AMMON[12]).

Zu diesem Zweck wurde das Muskelpräparat auf eine bestimmte Azetylcholinempfindlichkeit eingestellt und nach 1 oder 3 min langer Einwirkung der verschiedenen M.-Konzentrationen erneut mit Azetylcholin geprüft. Die Einwirkungszeit der Azetylcholinlösung betrug immer 1 min, dann wurde 2mal mit Froschringer gewaschen, wodurch die Azetylcholinkontraktur sofort gelöst wird.

M.-Konzentrationen von $1:10^9$—$1:10^6$ hatten unter diesen Bedingungen keine erkennbaren Wirkungen auf die Azetylcholinkontraktur. Nach M. $1:10^5$ war an allen Rektuspräparaten die Muskelkontraktion durch Azetylcholin deutlich gesteigert, beim Auswaschen verlief die Erholungsphase fast normal, gelegentlich blieb eine kleine Restkontraktur bestehen. Nach M. $1:10^4$ wurde die Azetylcholinmuskelkontraktion

fast auf das Doppelte des Normalwertes gesteigert. Nach dem Auswaschen war die Erholung immer verzögert und die Kontraktur blieb oft auf halbem Wege stehen. Auf diesen Zustand hatte Atropin in Konzentrationen von $1:10^5$—$1:10^4$ keinen, bei $1:10^3$ nur geringen Einfluß (s. Abb. 6). Dies ist aber nicht verwunderlich, nachdem Atropin in gleichen Konzentrationen auf eine bereits bestehende Azetylcholinmuskelkontraktur — auch ohne vorherige Einwirkung von M. — ebenfalls ohne wesentliche Wirkung ist. Erst bei Anwendung hoher Atropindosen (etwa $1:10^4$) vor der Azetylcholineinwirkung ist ein hemmender Einfluß auf die Kontraktur feststellbar (vgl. RIESSER[21]).

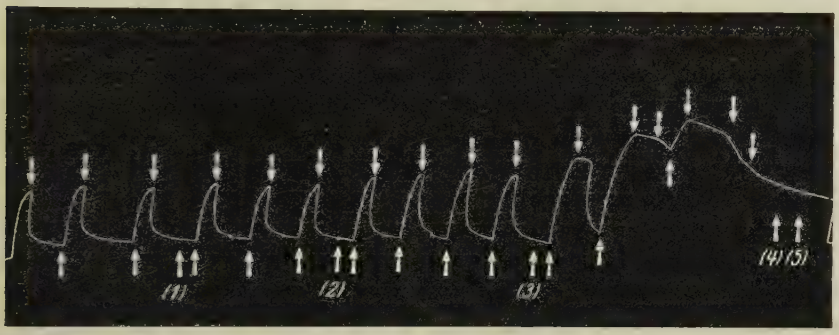


Abb. 6. Isolierter Froschrektus. Einwirkung von Mintacol auf die Azetylcholinkontraktur. ↑ Azetylcholin $1:5 \cdot 10^5$ (immer 1 min lang). ↓ 2mal Waschen mit Froschringer. Pfeil (1) Mintacol $1:10^6$, Pfeil (2) Mintacol $1:10^5$, Pfeil (3) Mintacol $1:10^4$ jeweils 1 min. Pfeil (4) Atropin sulf. $1:10^6$, Pfeil (5) Atropin suif. $1:10^5$.

Andere Phosphorsäureester verursachen dieselbe Steigerung der Azetylcholinwirkung. Es war auffallend, daß der Beginn der Wirkung für diese im gleichen Konzentrationsbereich von $1:10^5$ nachzuweisen war, z. B. auch für den Tetraäthylpyrophosphorsäureester. Bei E 605 $1:10^4$ und $1:10^3$ (letztere Konzentration mit Hilfe eines Netzmittels hergestellt) war keine Steigerung der Azetylcholinkontraktur feststellbar.

Physostigmin unter gleichen Bedingungen geprüft, verhielt sich bei einer Einwirkungszeit von 1 min ähnlich aber etwas schwächer als M.

E. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Bei dem Wirkungsbild von M. am Tier und Einzelorganen fallen die vielen Parallelen zu Physostigmin auf. Dies gilt am Tier z. B. für alle Symptome vegetativer Erregung wie Speichelfluß, Tränenfluß, vermehrter Kot- und Urinabgang, Brechreiz, Atemnot usw. Durch örtliche Anwendung am Auge tritt bei beiden Stoffen starke Pupillenverengerung auf, die durch Atropin aufgehoben, wie auch umgekehrt eine atropinisierte Pupille durch geeignete Dosierung von M. bzw. Eserin wieder zur Kontraktion gebracht werden kann. Es war auch

auffallend, daß bei Ermittlung der Toxizität am Frosch bei beiden Stoffen von vornherein Lähmungserscheinungen auftraten. An der weißen Maus wurden in kaum zu unterscheidender Weise durch beide Stoffe unter anderem Krämpfe ausgelöst, an der Katze fallen Erregungszustände auf, in ähnlicher Weise aber schwächer auch beim Kaninchen. Der Wirkung beider Stoffe ist mehr oder weniger fibrilläres Muskelzittern eigen.

Ebenfalls wie Physostigmin hemmt M. die Cholinesterase, es gehört zu den stärksten bisher überhaupt bekannten Hemmkörpern. Mit einem Wert von $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ molar (bzw. 0,0065 γ im Warburg-Trog oder 0,0036 γ/cm^3) für 50%ige Hemmung der Cholinesterase des Pferdeserums, erwies sich M. 10mal stärker hemmend als unter gleichen Bedingungen Physostigmin. Diese stark hemmende Wirkung auf die Serum-Cholinesterase trifft auch für andere Phosphorsäureester zu. Eine verhältnismäßig geringfügig erscheinende Abwandlung in der chemischen Konstitution kann aber eine erhebliche Herabminderung der Cholinesterasehemmung bewirken, das zeigt das Beispiel E 605. Dieser Stoff hat nach eigenen Untersuchungen etwa 1/200 der hemmenden Wirkung von M., obwohl im Molekül nur die Phosphorsauerstoffbindung $O = P\leqslant$ gegen eine Phosphorschwefelbindung $S = P\leqslant$ bei sonst gleicher Konstitution ausgetauscht ist. Auf die starke Hemmung durch DFP wurde bereits hingewiesen. MACKWORTH und WEBB[14] u. a. zeigten, daß die Bindung des DFP mit der Cholinesterase des Pferdeserums viel fester ist als diejenige des Physostigmins, bei dem die Reversibilität der Bindung bei Dialyse durch Untersuchungen von MATTHES[22] bekannt ist. Für den Fall, daß diese Einzelbeobachtung allgemein für die Phosphorsäureester gilt, ergibt sich, daß bei aller Ähnlichkeit der sonstigen Symptome zwischen der Wirkungsweise der Phosphorsäureester und des Physostigmins feinere Differenzen bestehen.

Am Beispiel M. und Physostigmin wird bereits deutlich, daß Körper aus chemisch völlig verschiedenen Gruppen die Cholinesterase mehr oder weniger stark hemmen können (vgl. hierzu die Zusammenstellung von R. AMMON[13]). Man geht wohl nicht fehl, wenn man nur dann der Cholinesterasehemmung eine Bedeutung für den Wirkungsmechanismus von Stoffen beimißt, wenn es sich um hochgradige Hemmung mindestens im Bereich der Gammawerte handelt, und diesen Stoffen nicht selbst eine azetylcholinähnliche Eigenwirkung zu kommt. Die hochgradige Hemmung trifft für M. und für andere Phosphorsäureester zu. Für DFP z. B. wurden von ADRIAN, FELDBERG und KILBY[10] und anderen Autoren die pharmakologischen Wirkungen auf die Hemmung der Cholinesterase bezogen. Demgegenüber lehnten C. HEYMANS und J. JACOB[23] auf Grund von Versuchen an Hunden, deren isolierter und durchströmter Kopf nur durch die Vagus-

nerven mit dem Rumpf verbunden war, einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Cholinesterase und den pharmakologischen Wirkungen von DFP ab. Bei ihrer Anordnung erhielten sie bei Konzentrationen, die sowohl die Pseudo- als auch die wahre Cholinesterase von Blut oder Gewebe weitgehend oder völlig hemmen, weder unmittelbare periphere cholinergische Reaktionen noch vom Vaguszentrum ausgehende gesteigerte Erregung. Andererseits haben neuerdings Jones, Meyer und Karel[24] am Beispiel einiger Phosphorsäureester, darunter DFP, Proportionalität zwischen dem Grad der Hemmung der wahren Cholinesterase und der Toxizität der Verbindungen an der weißen Maus festgestellt. Derartige Beziehungen gelten auch für andere chemisch einheitliche Stoffgruppen (vgl. Heim[25]). Schließlich haben weitere Untersuchungen von C. Heymans, Verbeke und Votava[26] ergeben, daß im Gegensatz zu der Auffassung mancher Autoren der sog. Pseudocholinesterase eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse und Inaktivierung des Azetylcholins in vivo zukommt, also ihre Hemmung zu einem Anstieg der Empfindlichkeit gegenüber Azetylcholin im Organismus führt.

Die außerordentliche Fülle von Beobachtungen und Arbeiten über die Beeinflussung der Cholinesterase durch Pharmaka darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß über die physiologische Rolle dieses Fermentes bei der Wirkung von Arzneimitteln und Giften noch nicht völlige Klarheit herrscht*. Es besteht aber wohl kein Zweifel, daß die Hemmwirkung von Eserin und den Phosphorsäureestern von grundlegender Bedeutung für die Wirkung dieser Stoffe ist. Auch im vorliegenden Fall gehört die hemmende Wirkung von M. zu den Grundwirkungen des Stoffes.

Neben der Steigerung der nervösen Erregbarkeit der peripheren Apparate durch Physostigmin wird diesem Stoff vielfach auch eine Erregbarkeitssteigerung an Teilen des Zentralnervensystems zugeschrieben. Ob und inwieweit derartige Wirkungen mit den cholinesterasehemmenden Eigenschaften des Stoffes zusammenhängen, ist wohl noch nicht genügend geklärt, Bovet und Bovet-Nitti[27]. Die Beschleunigung der Atmung zu Beginn der Physostigmineinwirkung

* Während Drucklegung dieser Arbeit erschienen:

1. Anticholinesterase drugs von G. B. Koelle und A. Gilmann [J. of Pharmacol. **95**, 166 (1949)]. In zusammenfassendem Referat sind zahlreiche vor allem anglo-amerikanische Arbeiten zu diesem Thema zitiert, die bisher zum Teil schwer oder nicht zugänglich waren.

2. Weiterhin: Studies on the toxicity and mechanism of action of p-nitrophenyl diethyl thionophosphate (Parathion) von K. P. Dubois, J. Doull, P. R. Salerno und J. M. Coon [J. of Pharmacol. **95**, 79 (1949)]. In dieser Untersuchung über das in USA. eingeführte Parathion (= E 605) finden sich auch Hinweise zur Pharmakologie von E 600.

ist sowohl auf Erregung des peripheren Lungenvagus als auch auf unmittelbare Erregung des Atemzentrums bezogen worden. Dixon und Ransom[16] erklären demgegenüber alle Physostigminwirkungen auf die Atmung mit der Verengerung der Bronchiolen. Zumindestens die der Atembeschleunigung folgende Atemnot bei Einwirkung toxischer Physostigmindosen ist wohl eine unmittelbare Folge der Bronchokonstriktion, also peripheren Ursprungs. Nach alten Untersuchungen von Harnack und Witkowski[28], die wohl im wesentlichen anerkannt werden, sollen durch Physostigmin die motorischen Rindenzentren erregbarer werden. Hierauf soll die Erregung von Kaninchen und Katze bei der Physostigmin-Intoxikation bezogen werden. Zugleich wird auch die Lähmung beim Frosch von Dixon und Ransom[16], E. Zunz[29] u. a. als zentrale Erscheinung angesehen.

Es ist naheliegend, einer Reihe der in gleicher Weise bei M. auftretenden Symptomen die gleiche Deutung zu geben. Dies bezieht sich beim Frosch auf die Lähmung, bei der Maus, Katze und Kaninchen auf die Unruhe und Erregung, auf die Gleichgewichtsstörungen und auf die Krämpfe. Diese Erscheinungen sind wohl auch als Folgen zentraler Wirkung des Stoffes anzusehen. Die Atemnot, die in vielen Fällen als unmittelbare Todesursache auffiel, wird wie beim Physostigmin als eine periphere Wirkung des Stoffes betrachtet.

Die Parallelität der Wirkung von M. mit Eserin zeigte sich auch in Versuchen an isolierten Organen.

Am isolierten Froschherz nach Straub waren die Grundwirkungen bei beiden Stoffen dieselben. Auf Blutdruck und Pulsfrequenz narkotisierter Hunde erwies sich M. im Bereich der Dosis tolerata ohne Wirkung. Toxische Dosen lassen jedoch an einer flüchtigen blutdrucksenkenden Wirkung erkennen, daß das Präparat auch in dieser Beziehung pharmakologisch zur Physostigmingruppe gehört. Deutlich war dieser Zusammenhang auch bei der indirekten Wirkung des Stoffes auf die Azetylcholinempfindlichkeit des isolierten Froschherzens und des Blutdruckes. In gleicher Weise wie bei Eserin wurde eine Steigerung des Azetylcholineffektes beobachtet, die auf die Hemmung der Cholinesterase des Herzgewebes bzw. des Blutserum zurückgeführt werden kann. Eine starke unmittelbare Wirkung zeigte M. am Darm. Am isolierten Kaninchendarm war noch durch eine Verdünnung 1 : 1 Milliarde eine flüchtige Steigerung von Peristaltik oder Tonus nachweisbar. In der Stärke dieser Wirkung entsprach der Stoff fast dem Azetylcholin. Auch am narkotisierten Kaninchen konnte kräftige Erregung der Peristaltik und des Tonus festgestellt werden, die auch den durch Atropin in seiner Motilität herabgesetzten Darm wieder in Bewegung bringt, wie umgekehrt Atropin die Wirkung von M. aufheben kann. Am Kaninchendarm zeigte sich demnach M. deutlich als vagomimetisches

Mittel. Auch am Darm wird die Azetylcholinwirkung durch M. gesteigert. Warum M. am Meerschweinchendarm verhältnismäßig nur schwach wirksam ist, kann vorerst nicht gesagt werden.

Am isolierten Froschrektus ließ sich nachweisen, daß M. in gleicher Weise und mindestens in gleicher Stärke wie Physostigmin die Erregbarkeit des Muskels für Azetylcholin erhöht. Im Einklang mit der viel schwächeren Hemmungswirkung auf die Cholinesterase des Pferdeserums fehlte dagegen dem Insektizid E 605 in den anwendbaren Konzentrationen diese Wirkung, während andere Phosphorsäureester z. B. der Tetraäthylpyrophosphorsäureester ebenfalls eine starke Steigerung der Azetylcholinkontraktur ergaben. Diese Wirkungen können mit der Hemmung der Cholinesterase im Muskelgewebe in Beziehung gebracht werden.

Die Feststellung, daß M. am glattmuskeligen Organ, am quergestreiften Muskel, am Herzmuskel, am Gefäßsystem für Azetylcholin sensibilisierend wirkt, weiterhin, daß einige unmittelbare Stoffwirkungen — am Auge und Darm — durch Atropin aufgehoben werden können, und daß die Toxizität durch Atropin beeinflußbar ist, zeigt die Beziehungen des Stoffes zum parasympathischen System. Es ergab sich, daß die Parallelen zur Wirkung des Physostigmins besonders eng sind. Die Unterschiede erscheinen meist viel weniger qualitativer Natur als mehr quantitativer Art.

Man kann daher M. im wesentlichen als *Parasympathikomimeticum* vom Typ des Physostigmins auffassen, dem ebenso wie diesem noch gewisse zentralnervöse Symptome im Wirkungsbild zukommen.

Zusammenfassung.

Mintacol (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat) ist ein in wäßriger Lösung haltbares synthetisches Parasympathikomimeticum vom Typ des Physostigmins.

Es hat starke unmittelbare Wirkungen auf Auge und Darm, es verursacht Miosis bzw. Steigerung der Darmmotilität. Diese Wirkungen sind durch Atropin aufhebbar. Die Toxizität am Tier wird durch Atropin antagonistisch beeinflußt. Am glattmuskeligen Organ, am Skeletmuskel, am Herzmuskel und am Gefäßsystem sensibilisiert der Stoff für Azetylcholin. Diese Wirkung ist auf hochgradige Hemmung der Cholinesterase zurückzuführen.

Literatur.

[1] Schrader, G.: The development of new insecticides. B. J. O. S., final Rep. No 714, **1947**, 21. — [2] Schrader, G.: Vgl. B. J. O. S., final Rep. No 1095, **1947**, 21. — [3] Schrader, G.: Zit. nach H. Martin, B. J. O. S., (Report im Druck). — [4] Schrader, G.: Z. angew. Chem. (im Druck). — [5] Lange, W., u.

G. v. Krueger: Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1598 (1932). — [6] Leopold, I. H., and J. Comroe: Arch. ophthalm. (Am.) **36**, 1 (1946). — [7] McCombie, H., and B. C. Saunders: Nature (Brit.) **157**, 287 (1946). — [8] Führer, H.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7 I, S. 601. 1923. — [9] Flury, F., u. F. Zernik: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7B, S. 1289. 1935. — [10] Adrian, E. D., W. Feldberg and B. A. Kilby: Brit. J. Pharmacol. **2**, 56 (1947). — [11] Dubois, K. P., and G. H. Mangun: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **64**, 137 (1947). — [12] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934). — Meth. Fermentforsch. **2**, 1585 (1941). — [13] Ammon, R.: Erg. Enzymforsch. **9**, 35 (1943). — [14] Mackworth, J. F., and E. C. Webb: Biochem. J. **42**, 91 (1948). — [15] Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 689 (1926). — [16] Dixon, W. E., u. F. Ransom: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, herausgeg. von Heffter, Bd. 2, 2. Hälfte, S. 786. 1924. — [17] Burgen, A. S. V., C. A. Keele, M. Chennels, I. del Castillo, W. F. Floyd, D. Slome and S. Wright: Nature (Brit.) **160**, 760 (1947). — [18] Magnus, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — [19] Trendelenburg, R.: Z. Biol. **61**, 67 (1913). Vgl. auch H. Schlossmann: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7B, S. 1786. 1935. — [20] Straub, W., u. P. Viaud: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 1 (1933). — [21] Riesser, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 342 (1921). — [22] Matthes, K.: J. Physiol. (Brit.) **70**, 338 (1930). — [23] Heymans, C., et J. Jacob: Arch. internat. Pharmacodynam. **74**, 233 (1947). — [24] Jones, H. W. jr., B. J. Meyer and L. Karel: J. Pharmacol. (Am.) **94**, 215 (1948). — [25] Heim, F.: Verh. dtsch. pharmak. Ges. **1948**. — [26] Heymans, C., R. Verbeke et Z. Votava: Arch. internat. Pharmacodynam. **77**, 486 (1948). — [27] Bovet, D., et F. Bovet-Nitti: Structure et activité Pharmacodynamique des Médicaments du système nerveux végétatif. Chap. XII, S. 431. 1948. — [28] Harnack, E., u. L. Witkowski: Arch. exper. Path. (D.) **5**, 401 (1876). — [29] Zunz, E.: Eléments de Pharmacodyn. Spéciale **1**, 318 (1932).

Prof. Dr. W. Wirth, Wuppertal-Elberfeld,
Pharmakologisches Institut der Farbenfabriken Bayer.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 569—575 (1949).

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske AG., Berlin (Prof. Dr. H. Ruska).

Der hämolytische Ikterus als Strukturproblem.

Ein elektronenmikroskopischer Beitrag zur Pathogenese der angeborenen hämolytischen Anämie.

Von

Bruno Lindemann.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. April 1949.)

Der angeborene hämolytische Ikterus (Minkowski-Chauffard) ist gekennzeichnet durch die im peripheren Blut auftretenden Kugelerythrozyten, deren osmotische Resistenz deutlich vermindert ist. Das pathologische Verhalten der Erythrozyten wird durch Hämolysine hervorgerufen, deren Existenz prinzipiell nachgewiesen ist und die vor allem in der Milz aber auch im übrigen retikuloendothelialen System gebildet werden. Trotz eingehender klinischer und experimenteller Untersuchungen ist die Frage, ob der der hämolytischen Anämie zugrunde liegende pathologische Mechanismus allein auf der vermehrten Bildung von Hämolysinen beruht, noch nicht definitiv entschieden worden. Nach Nägeli ist die gestaltliche Umformung der Erythrozyten in die Kugelform als Vorstufe zur intravital führenden Hämolyse mit allen den sich daraus ergebenden allgemeinen Folgeerscheinungen nicht eine Folge von Hämolysineinwirkung, sondern die Ursache liegt in einer strukturell minderwertigen Zellform selbst. Diese im Sinne einer echten Mutation durch vererbbare Bildungsanomalie hervorgerufene pathologische Zellform mit besonderer Hinfälligkeit, welche im Knochenmark präformiert und ins periphere Blut abgestoßen wird, erfährt in der peripheren Blutbahn eine beschleunigte Umbildung und Zerstörung.

Bei dem gegenwärtigen Stande der Frage nach der Pathogenese der angeborenen hämolytischen Anämie mag es vielleicht angebracht sein, über die ersten elektronenoptischen Untersuchungen an Kugelerythrozyten zu berichten, die zunächst nur als eine Einzelbeobachtung bewertet werden können und an weiteren Beispielen kontrolliert werden müssen, ehe sie verallgemeinert werden sollen. Es scheint aber nach den vorliegenden orientierenden Beobachtungen möglich zu sein, auf Grund elektronenoptischer Strukturanalysen das Problem der Pathogenese der angeborenen hämolytischen Anämie einer weiteren Klärung zuzuführen.

Die Besonderheiten der elektronenoptischen Untersuchungs- und Präparationstechnik sowie die Darstellung von osmotisch partiell hämolysierten Erythrozyten beliebiger Hämolysegrade sind in den vorangehenden Mitteilungen ausführlich erörtert worden, so daß wir uns hier mit einem kurzen methodischen Hinweis begnügen können. Für eine elektronenoptische Strukturanalyse des Zellinhaltes der Erythrozyten eignen sich besonders gut partiell hämolysierte rote Blutzellen und für die der Membran die Hypotonie-Hämolysereste, die nach vollständiger osmotischer Hämolyse in der Regel morphologisch weitgehend intakt bleiben. In konzentrierten Erythrozyten-Suspensionen mit kleinen Außenvolumina beobachtet man an allen der Hämolyse anheim fallenden Erythrozyten einen partiellen Hämoglobinverlust. Nach eingetretenem Hämolyseausgleich werden

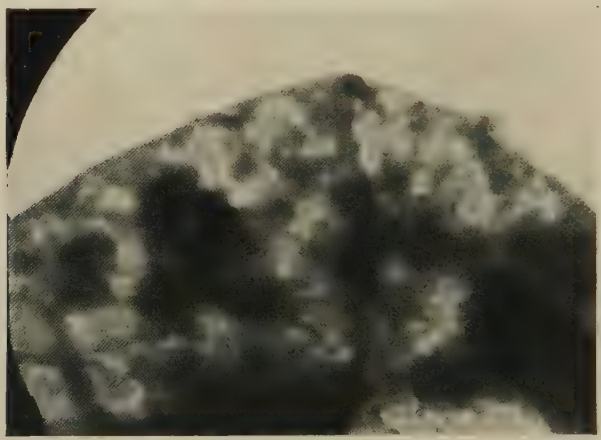


Abb. 1. Partiell hämolysierte Kugelzelle. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

die Suspensionen zentrifugiert, die Sedimente mit 1% Os04 fixiert und durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. die Fixationslösung, die strukturmaskierenden Bluteiweißkörper entfernt und die fixierten Zellen im Wassertropfen auf mit Zaponlack beschickte Platinblenden aufgetrocknet und elektronenmikroskopisch untersucht.

Für die Untersuchung wurde durch Venenpunktat frisch entnommenes Blut eines 45jährigen Hämolytikers defibriniert und osmotisch hämolysiert. Aderlaßblut eines 50jährigen Hypertonikers wurde 5 Std bei Zimmertemperatur warm gestellt, die im Serum suspendierten Erythrozyten osmotisch hämolysiert und in der angegebenen Weise für die elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert[1].

Die Abb. 1 gibt einen partiell hämolysierten Kugelerythrozyten aus dem peripheren Blut eines 45jährigen Mannes wieder, bei dem die typischen Zeichen eines angeborenen hämolytischen Ikterus mit nachweislicher Belastung der Aszendenz vorlagen (Abb. 1). Der osmotisch partiell hämolysierte und mit Os04 fixierte Kugelerythrozyt trägt die für partiell hämolysierte Erythrozyten kennzeichnende unterschiedlich körnige Strukturierung des Resthämoglobins, wie sie als Regelbefund

[1] Die Untersuchungen wurden in der I. Medizinischen Klinik der Charité, Berlin (Prof. Dr. R. SIEBECK) durchgeführt.

an den osmotisch hämolysierten Erythrozyten der Kugelformenreihe beschrieben wurde. Zur Zellmitte ballt sich der im Innern verbliebene Inhalt zusammen und läßt zum Rande die mehr aufgelockerten gekörnten Strukturen von unterschiedlicher Größe erkennen, die als Ausdruck zerfallender polymolekularer Hämoglobin-Assoziate aufgefaßt wurden. In den Membranfalten sammelt sich der Inhalt zumeist vermehrt an. Während nun die partiell hämolysierten Erythrozyten aus dem peripheren Blut eines Hämolytikers gegenüber den partiell hämolysierten normalen funktionstüchtigen Erythrozyten im Zellinnern keine

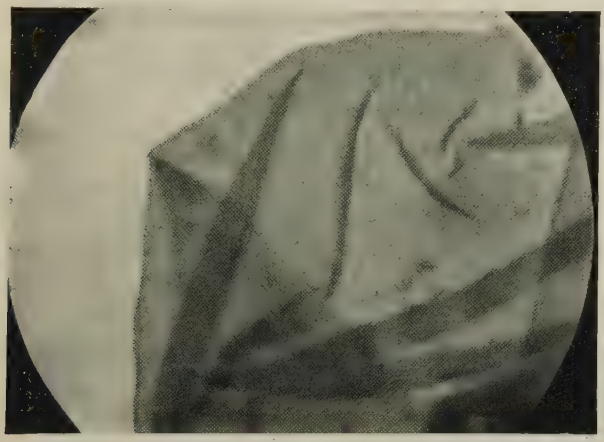


Abb. 2. Normale Erythrozytenmembran in der Sphäroform. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

abweichenden morphologischen Veränderungen aufweisen, lassen sich beim Vergleich einer normalen hämoglobinleeren Erythrozytenmembran und der leeren Kugel-Erythrozytenhülle deutliche Unterschiede in der Strukturzeichnung feststellen. Die mit Osmium fixierte normale reife Erythrozytenmembran hat eine nahezu homogene und glatte Texturzeichnung mit vereinzelten kleinfleckigen Verdichtungen, die an den Membranen jugendlicher Zellen ausgesprochener und gröber in Erscheinung treten. In der schlaffen Sphäroform trägt sie die bekannten für eine Ballonhülle so charakteristischen scharfkantigen Faltenwürfe (Abb. 2). Die Membran des Kugel-Erythrozyten hingegen weist ein eigentümliches feinwabiges Maschenwerk auf, zum Teil erkennt man auf begrenzten flächenhaften Bezirken ein feinporiges Lochwerk. Auch auf den Membranfalten treten diese eigentümlichen Strukturveränderungen hervor. Die kantigen Faltenschläge der Membran entsprechen denen normaler Erythrozytenhüllen (Abb. 3).

Diese an den Kugel-Erythrozytenmembranen als Regelbefund nachzuweisenden Strukturveränderungen werden in der gleichen Form und

Ausdehnung an den hämoglobinleeren Erythrozytenmembranen wiedergefunden, die von osmotisch hämolysierten normalen Erythrozyten gewonnen wurden, welche 5 Std im Aderlaßblut suspendiert waren. Die Abb. 4 gibt eine solche Erythrozytenmembran eines

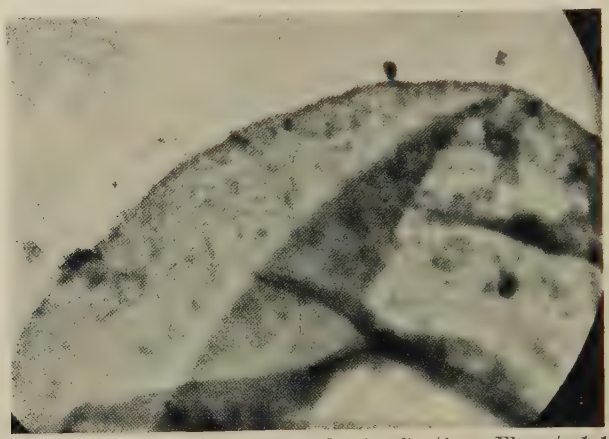


Abb. 3. Membran einer Kugelzelle. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

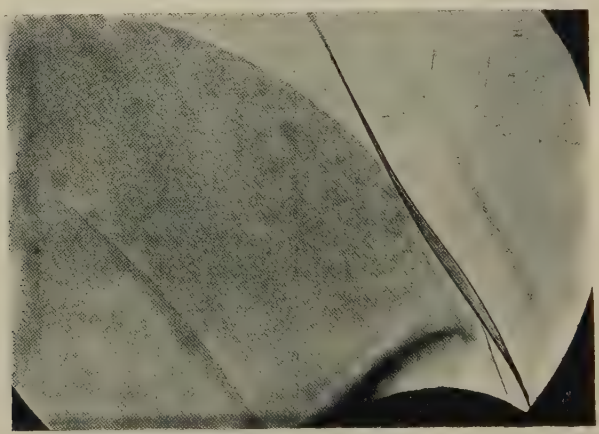


Abb. 4. Membran eines normalen Erythrozyten aus Aderlaßblut. Osmiumfixation. El. opt. 1:19000.

normalen Erythrozyten aus dem Aderlaßblut wieder, die unter den gleichen Bedingungen wie die Kugel-Erythrozytenmembran aufgenommen wurde. Auch hier finden wir dieses eigentümliche feinmaschige Wabenwerk mit zum Teil kleinen Porenbildungen wieder, welches am Rande dieses Hypotonie-Hämolyserestes hervortritt und von dem gewohnten Bilde der Texturzeichnung normaler Hypotonie-Hämolysereste deutlich abweicht.

Aus den Untersuchungen über den Zerfall von alternden Erythrozytenmembranen in vitro sind uns solche strukturveränderten Erythrozytenhüllen bekannt (Abb. 5). Diese eigenartigen morphologischen Strukturveränderungen an den Membranen von Kugelerythrozyten und den Hüllen von normalen Erythrozyten aus Aderlaßblut gleichen weitgehend den morphologischen Veränderungen, die ganz vereinzelt an einigen Hypotonie-Hämolyseresten von normalen Erythrozyten beobachtet wurden, die mehrere Stunden in Aqua dest. oder steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert waren und als beginnender

Abb. 5. Beginnender Zerfall einer alternden Erythrozytenmembran. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

Zerfall der alternden Erythrozytenmembran gedeutet wurden. Hypotonie-Hämolysereste von normalen Erythrozyten, die in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder Aqua dest. suspendiert sind, lassen vereinzelt einen Zerfallsprozeß erkennen, der mit Porenbildungen beginnt. Nachfolgend tritt eine Fragmentation der Erythrozytenhülle ein, aus der fortlaufend Bruchstücke herausfallen. Endzustand dieses Zerfallsprozeßes ist der sich auflösende zusammenhanglose Stromarest.

Fassen wir die vorstehenden elektronenmikroskopischen Beobachtungen kurz zusammen. An den Membranen von osmotisch hämolysierten Kugelerythrozyten lassen sich elektronenoptisch morphologische Strukturveränderungen nachweisen, die in der gleichen Form und Ausdehnung sich an den Membranen von normalen osmotisch hämolysierten Erythrozyten wiederfinden lassen, die 5 Std in Aderlaßblut suspendiert waren. Analoge Strukturveränderungen werden an den zerfallenden alten Erythrozytenmembranen beobachtet, die in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder Aqua dest. suspendiert sind.

Nach Bergenhem und Fahraeus entstehen bei Körpertemperatur im stillstehenden Blut, so auch in den Milzsinus, dem Stausee der

Milz, (Endopauseeffekt) enzymatisch gebildete Lysolecithine, die eine Herabsetzung der Aggregation und Senkungsgeschwindigkeit sowie eine Formänderung der Erythrozyten zur Kugelform bewirken, die spontan hämolysieren. Die durch enzymatische Abspaltung der ungesättigten Fettsäuren vom Lezithinmolekül gebildeten Lysolezithine werden nach Bergenhem und Fahraeus von den Blutkörperchen adsorbiert und haben eine hämolysierende Wirkung. Lysolezithin aus Eigelb kann z. B. noch in einer Verdünnung von 1:20000 (*Magistris*) Erythrozyten hämolysieren. Ein analoger Mechanismus liegt der Kobragift-Hämolyse zugrunde. Das Kobragift enthält bekanntlich eine Lezithinase.

Die elektronenoptischen Befunde an den Kugelzellenmembranen und den Membranen von normalen Erythrozyten aus Aderlaßblut lassen sich nach der Hämolysintheorie zwanglos deuten. Es kann angenommen werden, daß unter der Einwirkung von Hämolysinen, deren Angriffspunkt an der Membran liegt, eine zur Spontanhämolyse führende Permeabilitätsänderung der Erythrozytenhülle auftritt. Durch den Insult der osmotischen Hämolyse werden Strukturveränderungen sichtbar, die als Ausdruck eines Denaturierungsprozesses angesehen werden können. Die gleichartigen Strukturveränderungen an den Kugel-Zellenmembranen und den Membranen von normalen Erythrozyten aus Aderlaßblut sind zunächst kein Beweis für die Identität der Hämolysine, da sich solche Veränderungen auch an den alternden Erythrozytenmembranen wiederfinden lassen und demnach nur als ein allgemeiner Zerfallsprozeß gedeutet werden können, der zwar physiologischerweise nur an den alternden Erythrozytenhüllen auftritt, hier aber als Regelbefund an allen Membranen nachzuweisen ist.

Die Frage, ob in den Kugelzellen eine pathologisch präformierte Zellform im Sinne einer strukturellen Minderwertigkeit vorliegt, kann nur mit äußerster Zurückhaltung beantwortet werden, da die Untersuchungen an osmotisch hämolysierten Zellen vorgenommen wurde. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit läßt sich aber eine solche Annahme für den Zellinhalt der Kugelzellen ausschließen, da an ihm gegenüber dem normaler Erythrozyten keine morphologische Veränderungen elektronenoptisch sich nachweisen lassen. Aus den Untersuchungen an osmotisch hämolysierenden Erythrozyten ist uns bekannt, daß der reversible Gestaltwandel von der Scheiben- zur Kugelform der normalen Erythrozyten durch einen Spannungswechsel der Membran hervorgerufen wird, die physiologischerweise unter einem bestimmten Spannungszustand steht. Der Zellinhalt hat auf die Ausbildung dieser Gestaltformen keinen bestimmenden Einfluß. Am Kugelerythrozyten nimmt im physiologischen Milieu die Erythrozytenmembran die schlaffe Sphäroform an. Sowohl die zur Spontanhämolyse führende Permeabilitätsänderung, als auch der funktionelle Spannungszustand der

Membran deuten darauf hin, daß primär als Folge der Hämolysineinwirkung eine Strukturveränderung der Membran angenommen werden kann, woraus zwangsläufig ein Zerfall der molekularen physiologischen Bindungsgerüste im Zellinnern resultiert und das Hämoglobin in eine diffusible Größe zerfällt.

Zusammenfassung.

An den Hypotonie-Hämolyseresten von Kugelzellen und normalen Erythrozyten, die 5 Std bei Zimmertemperatur im Aderlaßblut suspendiert waren, lassen sich elektronenoptisch Strukturveränderungen feststellen, die als ein beginnender Zerfall der Erythrozytenhüllen gedeutet werden können. Die elektronenoptischen Befunde lassen sich im Sinne der Hämolysintheorie zwanglos auswerten. Es kann angenommen werden, daß das pathologisch-funktionelle Verhalten der Erythrozyten durch eine Strukturveränderung der Erythrozytenmembran verursacht wird, die als Folge der Hämolysineinwirkung entsteht.

Literatur.

Bergenhem, B., u. R. Fahraeus: Z. exper. Med. **97**, 555 (1936). — Chauffard: Sem. méd. (Fr.) **28**, 49 (1908). — Lindemann, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 197; **220**, 610 (1949). — Magistris: Biochem. Z. **210**, 85 (1929). — Minkowski: Verh. Kongr. inn. Med. **316** (1906). — Naegeli, O.: Verh. Kongr. inn. Med. **1928**, 511.

Dr. B. Lindemann, Hamburg, Allgem. Krankenhaus St. Georg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 576—585 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Leiter: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Beeinflussung der Entgiftungszeiten von Avertin und Pentothal-Natrium an der nebennierenlosen Ratte durch Nebennieren-Rindenhormon (Pentothal-Natriumtest).

Von

F. Eichholtz, R. Hotovy, P. Collischonn und H. Knauer.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. April 1949.)

Aus der Vielzahl der Mangelleistungen, die bei Mensch und Tier durch Ausfall der Nebennieren(NN)-Rindenfunktion entstehen, hebt sich unter anderem die erhöhte Empfindlichkeit gegen verschiedene Pharmaka hervor; dementsprechende Berichte liegen vor über Bakterientoxine, Adrenalin, Cholin, Curare, Narkotika wie Chloroform und Urethan und viele andere Stoffe. Diese erhöhte Empfindlichkeit gegen Gifte wurde bereits früher zur Bestimmung der NN-Insuffizienz herangezogen, so im Morphin-, Histamin-, Urethantest. Es zeigte sich aber, daß diese Testverfahren sich aus verschiedensten Gründen nicht durchsetzen konnten.

Der eine von uns (Eichholtz[1]) konnte vor längerer Zeit zeigen, daß NN-lose Kaninchen eine beträchtlich verlängerte Entgiftungszeit für Avertin besitzen. Auf dieser Beobachtung fußend, werden im folgenden einige Zusammenhänge zwischen NN-Insuffizienz und Narkosedauer dargestellt; demzufolge ist es heute möglich, mit einfacher Methodik zahlenmäßige Angaben über den Grad der Insuffizienz zu machen.

Methode. Diese ist im Laufe der ausgedehnten Versuche an mehreren hundert NN-losen Ratten mehrfach abgeändert worden, in ihrer letzten Form läßt sie sich folgendermaßen darstellen:

Für die Versuche wurden gesunde Albinoratten im Gewicht von 100—180 g verwendet, die meist vom gleichen Wurf stammten. Die NN-Exstirpation erfolgt einzeitig, und zwar vom Rücken her. Zwecks Überwindung des Operationsschocks erhielten die Tiere 2,5 mg/100 g Ratte Percorten öllöslich (Desoxykortikosteronazetat), intramuskulär injiziert, unmittelbar nach der Operation. Die operierten Tiere wurden nach Verzár[2] im Thermostaten bei 30° gehalten und bekamen als Futter Küchenabfälle von annähernd gleicher Zusammensetzung aus einer Diätküche. Das Avertin wurde 3%ig durch Schütteln und leichtes Erwärmen in Kuhmilch gelöst. Die intravenöse Injektion von 0,08 g Avertin je Kilogramm Ratte erfolgte langsam in etwa 1 min. Die Lösung in Milch ist notwendig, um Verätzung der Gefäße nach Möglichkeit zu vermeiden; es wurde nur frisch zubereitete Lösung verwendet. Unter Narkosedauer verstanden wir die Zeit von der Beendigung der Injektion bis zum spontanen Aufrichten des Tieres aus der Seitenlage. Als weiteren Test auf NN-Insuffizienz benutzten wir in den späteren Versuchen die Messung des Blutdrucks nach Moberg[3].

Die folgenden NN-Rindenpräparate wurden zu den Versuchen verwendet: 1. Desoxykortikosteronazetat in Öl gelöst (Percorten öllöslich), 2. Ein Glykosid des Desoxykortikosterons (Percorten wasserlöslich) mit einem Gehalt von etwa 50% Desoxykortikosteron. 3. Ein NN-Rindenextrakt des Handels (Eschatin*).

Im Laufe der Versuche zeigten sich Intoxikationserscheinungen durch die synthetischen NN-Rindenpräparate, so daß sich eine nähere Analyse als notwendig erwies.

Versuchsergebnisse.

1. Über akute Giftwirkung von Desoxykortikosteron.

Nach Verabreichung von Percorten wasserlöslich und Percorten öllöslich in höherer Dosierung treten bekanntlich bei normalen Ratten narkoseähnliche Zustandsbilder auf; durch Kontrolle des Blutdrucks und der Narkosezeit nach Avertingaben wurde eine Analyse der Intoxikation versucht. Es konnte festgestellt werden, daß nach Verabreichung von Percorten eine bedeutende Blutdrucksenkung, eine Verlängerung der Narkosezeit nach Avertin und bei höherer Dosierung Schlaf auftraten. Die Blutdrucksenkung ging nach 10—14 Std in eine Blutdrucksteigerung über. Durch Kaliumchloridgaben konnte die durch Percortenzufuhr hervorgerufene Hypotonie und die verlängerte Avertinnarkose abgeschwächt oder gar aufgehoben werden (Abb. 1). Diese Befunde waren wichtig, da nach Verabreichung von Percorten bei insuffizienten Tieren oft ein Kollaps auftrat, der meist zum Tode des betreffenden Tieres führte. Über die Empfindlichkeitssteigerung der NN-insuffizienten Ratten gegenüber der toxischen Wirkung von DOCA oder DOC-Glykosid kann gesagt werden, daß normale Ratten bei einer Dosierung von 10—25 mg Percorten wasserlöslich je 100 g intramuskulär in einen narkotischen Zustand gerieten, während schwer-

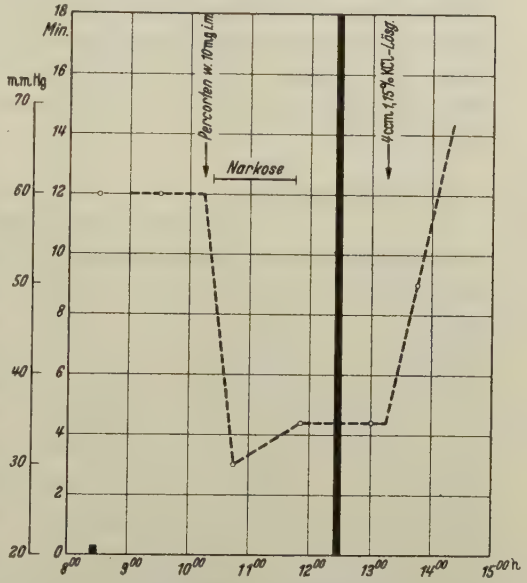


Abb. 1. Normale Ratte mit wasserlöslichem Percorten behandelt. — — — — Blutdruckkurve in mm Hg. Die Säulen bedeuten die Schlafzeit in Minuten nach einer intravenösen Injektion von 0,08 g Avertin je Kilogramm.

* Wir danken der Firma CIBA-Basel für Überlassung der Präparate.

insuffiziente NN-lose Ratten durch einmalige intramuskuläre Injektion von 2.5 mg/100 g Percorten öllöslich häufig und auf 2,5 mg Percorten wasserlöslich in der Regel kollabierten; aus diesem Grunde konnten schwerinsuffiziente NN-lose Ratten mit Hilfe solcher Stoffe zunächst nicht aus der Krisis gerettet werden. Bei Fraktionierung dieser gleichen Dosis und Verteilung über mehrere Stunden traten diese Intoxikationserscheinungen nicht auf. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß NN-lose Ratten bis 10mal empfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung von Percorten waren; eine Fraktionierung der nötigen Gesamtmenge unter Kontrolle der toxischen Effekte hatte zur Folge, daß schwer insuffiziente NN-lose Ratten noch aus der Krisis gerettet werden konnten.

2. Die Beeinflussung der Entgiftung von Avertin durch Percorten bei der NN-losen Ratte.

Die Symptome der NN-Rindeninsuffizienz an Ratten sind von vielen Autoren (Ingle, Verzár u. a.[2]) eingehend geschildert, so daß eine Wiederholung sich erübrigt. An normalen Ratten (über 100 Versuche) konnte gezeigt werden, daß eine wiederholte intravenöse Avertininjektion (0,08 g/kg) an mehreren Tagen konstante Schlafzeiten ergab; dies traf sogar bei einer wiederholten Injektion am selben Tag zu. Bei täglicher Avertinverabreichung (8—10 Tage) kann dann eine Verlängerung der Schlafzeit auftreten. Wurden Inzuchtratten vom selben Wurf für die Versuche verwendet, so ließ sich eine konst nte Schlafzeit unter den einzelnen Individuen feststellen. Wurde dagegen uneinheitliches Tiermaterial für die Schlafzeitbestimmung herangezogen, so wiesen sogar gesund aussehende Ratten mitunter eine verlängerte Entgiftungszeit für Avertin auf, wobei die normalen Werte von 20 sec bis $1^1/_2$ min auf 4—15 min ansteigen konnten. Ebenso fand sich bei Tieren mit Abszessen, Krätze, Schwanzödem, dagegen nicht bei hungernden Tieren eine beträchtlich verlängerte Schlafzeit von 4—10 min. Verlängerte Schlafzeiten konnten demnach nicht allgemein auf NN-Rindeninsuffizienz zurückgeführt werden. Im besonderen Falle der NN-Exstirpation indessen verlängerten sich die Schlafzeiten im Stadium der leichten Insuffizienz in der Regel um das 10—20fache, bei extremer Insuffizienz um das 100fache des Normalwertes. Es ergab sich, daß die relativen Entgiftungszeiten ein Maß für den Grad der NN-Insuffizienz der einzelnen Tiere darstellen (Tabelle 1). Percortengaben (2,5 mg Percorten öllöslich oder 3,5 mg Percorten wasserlöslich intramuskulär) konnten bei leichter Insuffizienz die verlängerten Schlafzeiten normalisieren und die Tiere aus der Insuffizienz retten. Sofern nach NN-Exstirpation Schlafzeiten von etwa 20 min überschritten wurden, versagte die sonst wirksame einmalige Percortengabe (öllöslich) von 2,5 mg/100 g, da —

wie wir heute wissen — die erhöhte Empfindlichkeit der Tiere gegen die toxischen Nebenwirkungen dieser Substanz dieses verhinderte. Im folgenden sei die Wirkung von wasserlöslichem Percorten an einem Versuch (Abb. 2) als Beispiel aus einer Reihe von 6 Versuchen erläutert.

Versuch 3. Weibliche Ratte, 130 g Gewicht. Die Schlafzeit nach Avertin wurde mit 10 sec bestimmt, anschließend wurden die Nebennieren exstirpiert und zum Schutz gegen Operationsschock NN-Rindenhormon verabfolgt. Nach Absetzen der Hormonzufuhr wurde die Verlängerung der Schlafzeit verfolgt, bis diese $4^1/_2$ min betrug, dann wurde wasserlösliches Percorten (2,5 mg/130 g Körpergewicht) verabreicht, wonach die Narkosedauer am nächsten Tag auf 20 sec gekürzt war. Mit dem Abklingen der Hormonwirkung trat nach 4 Tagen erneut, wie erwartet, die Verlängerung der Schlafzeit, und zwar auf 6 min auf. Durch abermalige Percortengaben konnte die Schlafzeit zum 3. und 4. Male normalisiert werden.

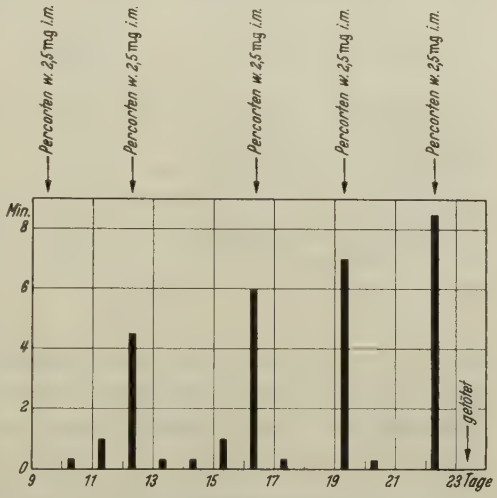


Abb. 2. Weibliche adrenalektomierte Ratte, 130 g Gewicht. Beeinflussung der Avertin-Entgiftungszeit (0,08 g Avertin je Kilogramm intravenös) mit Percorten wasserlöslich (2,5 mg intramuskulär).

In einer weiteren Versuchsreihe gelang die Verkürzung der Avertinschlafzeit auch mit öllöslichen Percortengaben. Hierbei zeigte sich, daß bei einmaliger intramuskulärer Gabe von 1,5 oder 2,5 mg öl- oder wasserlöslichem Percorten dieses nicht mehr wirkte, wenn die Narkosezeiten bei dem einen Rattenstamm von 10 min (bei einem anderen von 20 min) überschritten wurden. Die Wirkungsdauer von 1,5 mg öllöslichem Percorten je 100—130 g Ratte betrug 3 Tage, für 2,5 mg öllösliches Percorten 5 Tage und für 2,5 mg wasserlösliches Percorten (= 1,93 mg Percorten öllöslich) 2 Tage. Die auf Grund der Überlebenszeit bestimmte intramuskuläre Aufbrauchdosis war 0,5 mg pro die für eine 100—130 g schwere Ratte beim öllöslichen Percorten und 1,4—1,6 mg pro die für das wasserlösliche Percorten (entsprechend 1,07—1,23 mg öllöslichem Percorten). Dieses Dosen-Wirkungsverhältnis entspricht ungefähr den Angaben von R. Meier und Mitarbeitern[4] für den Hund. Bei Zufuhr von 50 HE Eschatin konnten schwerstinsuffiziente Ratten (4 Versuche) (Schlafzeit über 30 min) raschestens wiederhergestellt werden, ebenso war eine schnelle Erhöhung des Blutdruckes festzustellen. Als Nebensymptom nach Verabreichung von Eschatin intravenös traten

Tabelle 1.

Daten	Normale Ratten	Adrenalektomierte Ratten im kritischen NN-Insuffizienzstadium
Blutdruck in mm Hg	65 mm Hg	30—32 mm Hg
Avertinnarkosedauer (8 mg/100 g Ratte i.v.)	20 sec bis 2 min	20 min und mehr
Pentothal-Natrium-Narkosedauer (1,5 mg P. je 100 g Ratte i.v.)	10—60 sec	bis 120 min und mehr
Kotbeschaffenheit	geformt, hart	breiig, weich
Gesamteindruck des Tieres	lebhaft	adynamisch, apathisch, gesträubtes Fell
NN-Rindenhormondosis (mg/100 g Gewicht) zur Behebung der Krisis und Normalisierung des Blutdruckes		2,0—2,5 mg Percorten öllöslich 50 HE Eschatin 2,5—4,5 mg Percorten wasserlöslich
Tägliche Aufbrauchdosis von NN-Hormon auf 100 g Ratte bezogen		etwa 0,3—0,5 mg Percorten öllöslich etwa 1,25 mg Percorten wasserlöslich etwa 10—25 HE Eschatin

Krämpfe auf, die wohl auf den Phenolgehalt des Präparates zurückzuführen sind. Insuffiziente Tiere werden nämlich auch gegen Phenol überempfindlich. Die Schlafzeit konnte mit 50 HE wieder normalisiert werden.

3. Die Beeinflussung der Entgiftung von Pentothal-Natrium durch Percorten bei der NN-losen Ratte.

Als weiteres Narkotikum wurde das Pentothal-Natrium [Äthyl-(1-Methylbutyl)thiobarbitursaures Natrium] für die Untersuchungen herangezogen. Pentothal-Natrium wurde als 1%ige Lösung in der Menge von 0,15 cm^3/100 g Ratte intravenös verabreicht. Dieses hatte gegenüber dem Evipan-Natrium bei intravenöser Verabreichung den Vorteil, daß es bei Ratten kein so ausgeprägtes Exzitationsstadium hervorruft. Es zeigte sich weiter, daß bei der Verwendung dieses Präparates die Venen geschont werden und daß die Nachwirkungen bei NN-insuffizienten Tieren geringer und kürzer waren als beim Avertin.

Auf Grund unserer Versuche an 80 Tieren konnten wir unter anderem folgende Beobachtungen anstellen. Die verwendete Pentothal-Natrium-Dosierung lieferte an normalen Ratten sehr konstante Schlafzeiten von 20—40 sec. Adrenalektomierte Ratten, die nach der Operation 2,5 mg Percorten öllöslich verabreicht bekamen, wiesen ebenfalls in den ersten Tagen eine normale Entgiftungszeit auf. Insuffiziente adrenalektomierte Tiere dagegen hatten eine stark verlängerte Schlafzeit (bis zum

360fachen). Auf Grund dieses *verringerten Entgiftungsvermögens*, durch den Nachweis des *gesenkten Blutdruckes* und der sonstigen sichtbaren Insuffizienzzeichen (Adynamie, Apathie, Beschaffenheit von Fell, Kot, gelegentlich Ödemneigung) konnte das kritische Insuffizienzstadium zahlenmäßig festgelegt werden.

Wenn infolge der Insuffizienz der Blutdruck auf 32 mm Hg gesenkt war und gleichzeitig eine hohe Schlafzeit festgestellt werden konnte, dann trat nach dem Aufwachen eine Krisis auf. Die Tiere sind dann sehr mitgenommen, liegen auf der Seite und machen einen sehr kranken Eindruck. Aus diesem kritischen Stadium konnten sie nicht durch einmalige Percortengaben herausgebracht werden, sondern zunächst nur durch Percortengaben mit Eschatin, später durch mehrmalige (bis 9mal) stündliche intramuskuläre Gaben von 0,1—0,2 cm³ Percorten öllöslich (=0,5—1,0 mg Percorten), gemeinsam mit intraperitonealer Injektion von 3—4 cm³ Tyrodelösung von 37° C. Durch die letztere Medikamentation konnte die schwerste NN-Insuffizienz behoben werden. Der Gewichtsverlust und die Freßlust wurden dabei wieder normalisiert. Nach dieser Testierungsmethode (Blutdruckmessung, Schlafzeitbestimmung) waren anfangs große Percortenmengen zur Beseitigung der kritischen NN-Insuffizienz nötig, während nachher die Aufbrauchdosis geringer wurde. Durch Kontrolle des Blutdruckabfalles wurde die tägliche Aufbrauchdosis bis zum Eintritt der Insuffizienz mit 0,3 bis 0,5 mg/100 g Percorten öllöslich festgestellt; der Tag des Auftretens von schweren Insuffizienzerscheinungen war an Hand der täglichen Aufbrauchdosis dabei rechnerisch vorauszusagen.

Das folgende Versuchsbeispiel zeigt die Berechnung des kritischen Insuffizienztages (Abb. 3). Nachdem die Ratte am 13. Tag zum zweiten Male in der Krisis war (Blutdruck 30 mm Hg und Pentothal-Natriumschlafzeit 80 min), wurde dem 170 g schweren Tier Percorten öllöslich in 12 Einzeldosen von insgesamt 7,75 mg Hormon intramuskulär injiziert. Durch diese Hormonmenge wurde dann die Hypotonie behoben und ein normaler Blutdruck von 62 mm Hg erreicht. Die verlängerte Schlafzeit wurde von 80 min auf 6 min reduziert. Zur Behebung dieser Krisis waren also immer, fraktioniert verabreicht, 2,5 mg, nach weiteren Erfahrungen 2,0—2,5 mg Percorten öllöslich je 100 g Gewicht 2 Tage hindurch notwendig.

Die weitere Percortengabe am 3. Tag diente vorwiegend der Erhaltung; die Erhaltungsdosis wurde in zahlreichen Versuchen mit 0,3—0,5 mg Percorten öllöslich je 100 g Gewicht und Tag ermittelt. Unser Versuchstier hatte an 3 Tagen insgesamt 12 mg Percorten öllöslich erhalten oder 7,05 mg auf 100 g Gewicht. Von diesen 7,05 mg Percorten öllöslich sind 5,0 mg Percorten je 100 g Gewicht zur Behebung der Insuffizienz nötig; zur Erhaltung dienten demnach 2,05 mg. Bei einer täglichen Erhaltungsdosis von 0,3 mg Percorten je 100 g Gewicht mußte demnach die Krisis nach 7 Tagen auftreten. Dies ist an Hand der Abb. 3 zu ersehen.

Bei dem von 7 Versuchen als Beispiel angeführten Versuch (Abb. 3) konnte eine verlängerte Entgiftungszeit (Schlafzeit) im Insuffizienz-

stadium bis um das 360fache, d. h. von 20 sec auf 120 min erzielt werden; durch fraktionierte stündliche Percortengaben und intraperitoneale Injektion von Tyrodelösung wurde dann die Insuffizienz behoben, bzw. das normale Entgiftungsvermögen gegenüber Pentothal-Natrium wiederhergestellt (Abb. 3). Das nach der ersten Insuffizienz verabreichte Eschatin wurde aus Sicherheitsgründen gegeben, da wir annahmen,

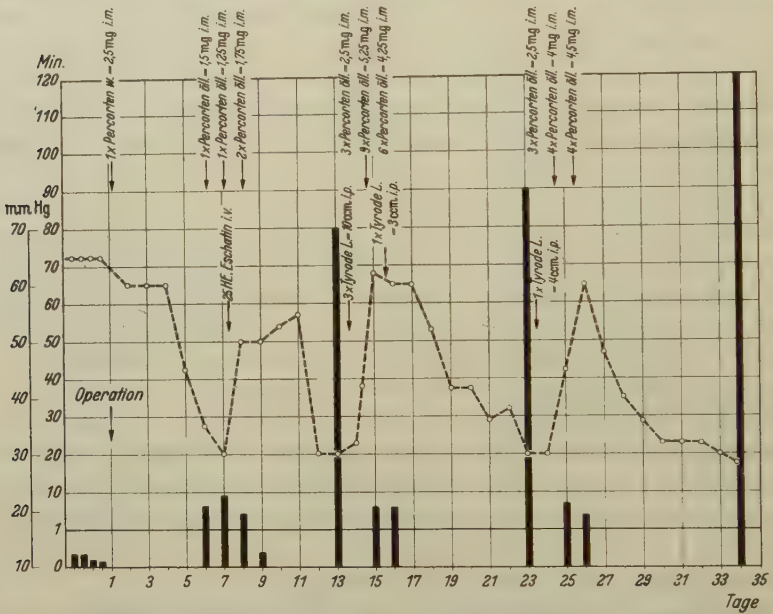


Abb. 3. Weibliche adrenalektomierte Ratte. Beeinflussung der Pentothal-Natrium-Entgiftungszeit mit Percorten öllöslich, Eschatin und Tyrodelösung. ——— Blutdruckkurve in mm Hg. Die Säulen bedeuten die Schlafzeit in Minuten nach intravenöser Injektion von 0,15 cm³ einer 1%igen Pentothal-Natrium-Lösung auf 100 g Gewicht.

daß das Tier möglicherweise durch die alleinige Gabe von Percorten öllöslich zu stark gefährdet würde und weil Eschatin ohne toxische Nebenwirkungen (außer durch Phenolzusatz) innerhalb einer $^1/_4$ Std auf die Insuffizienzerscheinungen einwirkt. Nach der zweiten Insuffizienz wurde indessen die fraktionierte Percortenverabreichung ohne Eschatinzusatz angewandt, wobei gleichzeitig zur Sicherheit mehrere intraperitoneale Gaben von Tyrodelösung die Therapie unterstützten. In der dritten Insuffizienz konnte gezeigt werden, daß die fraktionierte Percortenzufuhr und *einmalige* Tyrodegabe das Tier aus der schwersten Insuffizienz herausbrachte und die Kontrolle des Blutdruckes einen normalen Wert lieferte. Auch dieser Versuch mit Tieren in wiederholter schwerster Insuffizienz bestätigt die unitarische Ansicht von Verzár[2], daß nämlich das Desoxykortikosteron (Reichstein) alle therapeutischen Eigenschaften der NN-Rindenextrakte besitzt mit der Einschränkung,

daß die toxischen Nebenwirkungen verschieden sind. Nach mehrmaliger schwerer Insuffizienz war ein Erreichen der alten Schlafzeit (Entgiftungszeit) von 30 sec allerdings bisher nicht möglich.

Besprechung.

Als Folge einer hohen Desoxykortikosteronazetat- oder Glykosidzufuhr konnte die von Selye[5] und vielen anderen beschriebene narkotische Wirkung bei der Ratte bestätigt werden. Durch die fortlaufende unblutige Blutdruckmessung am intakten Tier wurde eine bedeutende Blutdrucksenkung nachgewiesen, die auch von R. Meier u. a.[4] am narkotisierten Kaninchen nach intravenösen Gaben von 50 mg/kg Percorten wasserlöslich beobachtet wurde, während am Hund und Kaninchen bei der allgemeinen Toxizitätsprüfung Dosen von 50 mg/kg ohne Erscheinungen vertragen wurden. Die Schlafzeitbestimmung mit Avertin zeigte hierbei eindeutig, daß die Narkosedauer (Entgiftung) schon bei niedriger Percortengabe (Desoxykortikosteronazetat und -glykosid) eine bedeutende Verlängerung, d. h. eine verzögerte Entgiftung aufwies. Dieser Effekt hängt möglicherweise zusammen mit der sedativen oder narkotischen Wirkung des Hormons. Nach Selye[5] wird Desoxykortikosteron — ebenso wie man es für Avertin und Pentothal-Natrium angenommen hat — in der Leber entgiftet,so daß mit einer möglichen Konkurrenz der Entgiftungsvorgänge zu rechnen wäre. Man kann weiter an das Nachlassen der Kreislauftätigkeit oder an die vielfachen Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels denken; entscheidend indessen scheinen die Mineralverschiebungen innerhalb der Zellen zu sein. Die Schlafzeit konnte nämlich durch KCl-Gaben verkürzt werden, obwohl die Werte von Kalium und Natrium im Serum nach toxischen Percortengaben keine eindeutigen Unterschiede von der Norm ergaben. Die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber den toxischen Nebenwirkungen von Percorten ist in der NN-Insuffizienz auf etwa das 10fache gesteigert.

Die wichtige Erkenntnis, daß man durch Fraktionierung der notwendigen Gesamtdosis von Percorten die akute Giftwirkung (Blutdruckabfall, verminderte Entgiftungsmöglichkeit für Narkotika) verhindern kann, führte erst zur erfolgreichen Therapie der schwersten NN-Insuffizienz bei epinephrektomierten Ratten. Durch wiederholte Gaben von kleinen Hormonmengen (0,1 mg/100 g) und gleichzeitiger Tyrodezufuhr konnten sämtliche Tiere aus der Krisis gerettet werden. Mit Hilfe der Schlafzeitbestimmung (Entgiftungsvermögen) durch intravenöse Injektion von Avertin oder Pentothal-Natrium bei gleichzeitiger Messung des Blutdruckes wurde eine neue Auswertungsmethode für NN-Rindenhormon an epinephrektomierten Ratten ausgearbeitet. Die Vorteile dieser Methode sind dabei, daß die fortlaufende Blutdruckmessung und die bei fallenden Blutdruckwerten mit Avertin oder

Pentothal-Natrium durchgeführte Schlafzeitbestimmung genaue Zahlenwerte über die Stärke der Insuffizienz des Tieres lieferten. Die Pentothal-Natriumnarkose ist dabei derjenigen mit intravenös zugeführtem Avertin durch die geringeren Nachwirkungen überlegen. Andere intravenös verabreichte Narkotika wie Urethan, Paraldehyd und Evipan-Natrium haben sich nach unseren Erfahrungen weniger bewährt, obwohl auch in diesen Fällen die Entgiftung durch NN-Rinde gesteuert wird. Ein weiterer Vorteil der angeführten Auswertung gegenüber der Testierung am Hund ist der geringere Arbeitsaufwand und die Möglichkeit, die Versuche an einer größeren Anzahl ingezüchteter Ratten auszuführen.

Die Versuche mit Avertin, Pentothal-Natrium und anderen Schlafmitteln weisen demnach darauf hin, daß die Nebenniere, bzw. das NN-Rindenhormon eine überragende Rolle bei der Entgiftung dieser Narkotika spielt. Das gleiche gilt voraussichtlich für alle übrigen Barbitursäuren. Der eine von uns (E.) hat darauf hingewiesen, daß stündliche intravenöse Injektionen von Avertin beim Kaninchen mit gleicher Geschwindigkeit entgiftet werden. Beck und Lendle[6] zeigten weiter, daß Ratten, die 1—2mal täglich über längere Zeit hindurch mit größeren Avertindosen behandelt wurden, kein gehemmtes Entgiftungsvermögen aufwiesen. Diese Angaben konnten auch wir bestätigen. Als Hauptorgan für die Entgiftung von Avertin und Pentothal-Natrium wird vielfach die Leber angenommen (Sebening[7]), obwohl Versuche mit Lebergiften keine eindeutigen Befunde ergaben (Eichholtz[1]); doch sind hier weitere Beobachtungen notwendig. Immerhin erfolgt die Elimination in Bindung mit Glukuronsäure, deren Synthese möglicherweise vom Glykogengehalt der Leber abhängig ist. Dem widerspricht die Beobachtung, daß hungernde Ratten keine verzögerte Entgiftung, gemessen an der Schlafzeit, aufweisen. Andererseits wird der Glykogenaufbau in der Leber bekanntlich auch durch das NN-Rindenhormon besonders gefördert. Doch ist der Zusammenhang dieser Vorgänge mit der Entgiftung von Schlafmitteln noch weitgehend ungeklärt.

Aus den vorgetragenen Befunden können auch wichtige Rückschlüsse auf die Anwendung der angeführten Narkotika am Menschen gemacht werden. Das individuelle Entgiftungsvermögen spielt bei der Wirkung, besonders der Wirkungsdauer der intravenös verabreichten Narkotica eine gewisse Rolle, wie Versuche mit verschiedenen Tierstämmen lehren. Doch müssen auch weitere, bis heute noch nicht genauer definierte Faktoren von Bedeutung sein. Einer dieser Faktoren liegt in der Funktion der NN-Rinde; denn auch eine leichte NN-Insuffizienz hat bereits einen meßbaren Einfluß auf das Entgiftungsvermögen von Avertin und Pentothal-Natrium. Es wäre wichtig zu wissen, ob eine klinisch bedingte NN-Insuffizienz (Sepsis, Infektionen, Intoxikationen usw.) ebenfalls, wie zu erwarten ist, mit Verlängerung der Entgiftungs-

zeiten von Avertin und Pentothal-Natrium einen Einfluß hat. Weitere Faktoren, die mit der Entgiftung der Schlafmittel zusammenhängen, (Marasmus, bestimmte Infektionen u. a.) bedürfen noch der näheren Analyse.

Zusammenfassung.

1. Die Entgiftungszeiten für Avertin und Pentothal-Natrium — bei weißen Ratten intravenös injiziert — steigen bei zunehmender NN-Insuffizienz an, bei Avertin bis zum 100fachen, bei Pentothal-Natrium bis zum 360fachen; der erste Anstieg tritt ein, bevor andere Insuffizienzsymptome nachweisbar sind. Diese Entgiftungszeiten geben ein Maß für die NN-Rindeninsuffizienz. Darauf gründet sich eine neue Methode zur Testierung von NN-Rindenhormon.

2. NN-lose Ratten können wiederholt aus schwerster Krisis gerettet werden durch fraktionierte Dosierung von Desoxykortikosteronazetat (Percorten öllöslich) bei gleichzeitiger intraperitonealer Zufuhr von Tyrodelösung. Die für schwerste Insuffizienz notwendige tägliche Aufbrauchdosis ist etwa doppelt bis 3fach so hoch wie die gewöhnliche Erhaltungsdosis. Bei Anwendung natürlicher Extrakte (Eschatin) erhält man etwas raschere Effekte; infolge des Phenolgehaltes der Eschatinlösung können bei NN-losen Ratten Vergiftungen entstehen, so daß auch sie fraktioniert gegeben werden muß.

3. Die zur Rettung der Tiere aus schwerster Krisis notwendige Menge von Desoxykortikosteronazetat kann nicht auf einmal injiziert werden, da insuffiziente Tiere gegen die toxischen Nebenwirkungen des Stoffes etwa 10mal empfindlicher sein können als normale Tiere. Die Giftigkeit äußert sich bei normalen Ratten in einer verlängerten Entgiftungszeit für Schlafmittel, in Blutdruckabfall und eventuell in Schlafzuständen; bei insuffizienten Tieren können schwerer Kollaps und Exitus hinzutreten.

4. Pentothal-Natrium hat als das bisher beste Mittel zur Testierung der NN-Rindenfunktion zu gelten, und zwar wegen der guten örtlichen Verträglichkeit bei intravenöser Injektion, der starken Abhängigkeit der Entgiftungszeiten von der NN-Funktion, sowie durch seine geringen Nachwirkungen auch bei insuffizienten Tieren.

5. Die möglichen klinischen Folgerungen aus unseren Beobachtungen werden gestreift.

Literatur.

[1] Eichholtz, F.: Dtsch. med. Wschr. **1927**, 710. — [2] Verzár, F.: Die Funktion der Nebenniere. Basel 1939. — Lehrbuch der Inneren Sekretion. Liestal 1948. [3] Moberg, E.: Skand. Arch. Physiol. (D.) **69**, 221 (1934). — [4] Meier, R., H. Gysel u. R. Müller: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 93. — [5] Seley, H.: Anesth. et Analg. **22**, 105 (1943). — J. Labor. a. clin. Med. (Am.) **27**, 1051 (1942). — [6] Beck, A., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. (D.) **164**, 201 (1932). — [7] Sebening, W.: Schmerz usw. **1930**, 403.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 586—593 (1949).

Aus dem Pharmakologisch-Pharmakognostischen Institut der ehemaligen Deutschen Karls-Universität in Prag (Direktor: Prof. Dr. Kuschinsky).

Über die Filtration und Wassersekretion in der Froschniere.

Von

Rudolf Hotovy.

(Eingegangen am 22. April 1949.)

An der isoliert durchströmten Froschniere sind grundlegende Probleme der Nierenphysiologie untersucht worden. Der Nierenpfortaderkreislauf läßt bei ihr die isolierte Durchströmung des Tubulusabschnittes zu und dadurch konnten Stoffe, die nur durch aktive Sekretion ausgeschieden werden, leicht von jenen, die primär nur durch Ultrafiltration des Plasmas im Glomerulus in den Harn gelangten, getrennt werden. Dabei betrug das Verhältnis U/P mg-% (Harn mg-% : Plasma mg-%) bei den filtrierten und nicht rückresorbierbaren Substanzen (Kreatinin, Inulin) der isoliert durchströmten Froschniere nur 1,2 bis 3,0, während es bei den sezernierten Stoffen (z. B. Phenolrot) den Wert 70,0 erreichte. Doch konnte hier kein Nachweis erbracht werden, daß auch Wasser sezerniert werden kann, denn bei der Nichtdurchströmung des Glomerulus sistierte jede Harnbildung.

Volhard[1] nahm an, daß in der menschlichen Niere bei bestimmten Krankheitsbildern, wo alle Glomeruli blutleer sind, eine Wassersekretion durch die Tubuli auftreten kann. An der Froschniere wurde von Ellinger und Hirt[2] mit Hilfe der Intravitalmikroskopie festgestellt, daß im Winter die 2. Abschnitte der Tubuli in ausgedehntem Maße die Ausscheidung von Wasser, Säure und Fluorescein-Natrium an Stelle der ausgeschalteten Glomeruli übernehmen. Die Injektionsversuche von Frey[3] am Kaninchen weisen auch auf eine Wassersekretion hin, da während der Wasserdiurese, etwa dem von Ellinger und Hirt beobachteten Nierenbild entsprechend, die Möglichkeit einer direkten Blutversorgung des sezernierenden Tubulus auf Kosten des vermindert durchbluteten Glomerulus besteht. Auch Kuschinsky und Langecker[4] fanden auf Grund ihrer an Hunden ausgeführten Versuche, daß z. B. bei der Phenolrotsekretion zusätzlich auch Wasser sezerniert werden kann. Alle diese Befunde sind am ganzen Säugetier gemacht worden. Beim intakten Frosch dagegen wurde die Größe der Filtration, soweit die Literatur zu übersehen war, nicht bestimmt. Bei diesem Tier müßte eigentlich eine zusätzliche Wassersekretion angenommen werden, da die Verhältnisse der Quotienten U/P bei dessen isoliert durchströmter

Niere für die filtrierten (Kreatinin, Inulin) und sezernierten (Phenolrot) Substanzen groß sind. Eine Säugetierniere ist z. B. nicht imstande, Phenolrot bis zum 50fachen des U/P mg-% Kreatininwertes zu konzentrieren.

Im folgenden soll mit Hilfe des endogenen und exogenen Kreatinins, des Cyanols und Inulins die Größe der Filtration bestimmt und eine Reihe von Beispielen von erfolgter Wassersekretion der Froschniere mitgeteilt werden.

Methodik.

Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen Fröschen (Species Rana ridibunda) ausgeführt, die vor dem Versuch, nachdem sie aus dem Keller geholt worden waren, für einige Stunden dem Licht ausgesetzt wurden. Die Tiere befanden sich während der Versuchszeit unter einer Glasglocke, die ein feuchtes Zellstoffstück als Unterlage hatte. Die Filtrationstestsubstanzen wurden in den Rückenlymphsack sorgfältig injiziert. Die Flüssigkeitsmenge betrug dabei 0,1 cm^3 auf 10 g Frosch gerechnet. Das Kreatinin (Kreatinin Merck) wurde als 0,8 und 2%, das Inulin (Inulin purissimum Kahlbaum) als 0,3 und 8% und das Cyanol (Cyanol, Hollborn & Söhne) als 0,2% Lösung (0,65%ige NaCl-Lösung) verwendet. Das Blut wurde entweder durch einen Einschnitt in die Arteria temporalis in der Höhe des Processus zygomaticus gewonnen, weil hier eine starke Blutung ohne Lymphbeimengung erreicht werden kann, oder durch Anschneiden der Vena abdominalis. Dies wurde folgendermaßen ausgeführt: Der mit Äther narkotisierte Frosch wurde auf ein mit einem Stativ versehenes Froschoperationsbrett mit der Bauchseite nach oben, bei über die Brettkante hängenden Hinterextremitäten, nur an den vorderen Extremitäten mit Bindfaden fixiert. Nach einem medianen Hautschnitt wurde einen halben Zentimeter beiderseits und parallel der Vena abdominalis der Musculus rectus abdominis durchtrennt und kranial abwärts in Lebernähe 2 Ligaturen angelegt. Die Vena abdominalis mit dem Musculus rectus abdominis wurde zwischen den Ligaturen durchtrennt und nach kaudalwärts umgeklappt. Hierauf wurde eine Glaskanüle in die Vena abdominis eingeführt, ligiert und das ausfließende Blut in einem mit Ammoniumoxalat versehenen Zentrifugengläschen aufgefangen. Das Plasma wurde durch rasches Zentrifugieren (12000 Umdrehungen) gewonnen. Für die Cyanolbestimmung muß das Plasma hämoglobinfrei sein. Die erste Art der Blutentnahme diente zur Bestimmung des Plasmaspiegels der zu untersuchenden Substanzen unter möglichster Schonung des Tieres. Dieser $1^1/_2$ Std nach der Injektion gewonnene Wert ist fast identisch mit demjenigen, der eine weitere halbe Stunde danach durch Venaesectio gewonnen wurde.

Die chemischen Bestimmungsmethoden sind für die geringen Plasmamengen angepaßt worden (s. KUSCHINSKY und LANGECKER[4, 5]). Die Analysen wurden in Doppelbestimmungen ausgeführt und nur die übereinstimmenden Werte verwendet. Das Kreatinin wurde nach Folin und Wu bestimmt. Die kolorimetrische Bestimmung, auch der übrigen Substanzen, geschah im Photozellenkolorimeter nach HAVEMANN. Es wurden die Halbmikroküvetten (2 cm Schichtdicke) und als Filter BG 7 (SCHOTT) verwendet. Die Inulinbestimmung wurde nach der Methode von ALVING und Mitarbeitern[8], modifiziert nach KUSCHINSKY und LANGECKER[4, 5], vorgenommen. Die Mengen waren ein Fünftel kleiner als bei der Originalmethode. Vor der Vergleichsphotozelle des Kolorimeters mußte zwecks genauer Nullpunkteinstellung ein OGl-Filter in den freien Spalt gesteckt werden, als Inulinfilter (Filter zwischen der Küvette und der Photozelle) wurde RGl verwendet. Das Cyanol wurde direkt im Plasma und Harn nach entsprechender Verdünnung kolorimetrisch unter Benutzung eines RGl-Filters bestimmt. Die genaue Abmessung der Flüssigkeit erfolgte mit Hilfe der Präsidenzspritze nach KÜHN[9], die sehr exakte Werte lieferte. Der Harn wurde mittels eines hakenförmig gebogenen Glaskatheters halbstündig gewonnen und die Menge gravimetrisch bestimmt. Nur einwandfrei gewonnene Harnmengen wurden der Analyse zugeführt. Die meisten Frösche hielten den Harn ohne weiteres eine halbe Stunde lang an. Hie und da sind auch Exemplare vorhanden gewesen, die unruhig waren und Harn verloren. Diese wurden sofort aus der Versuchsserie ausgeschieden. Aus den Analysen des Harns und des Plasmas wurden berechnet 1. das Glomerulusfiltrat nach REHBERG und 2. die Clearance in der üblichen Weise (s. KUSCHINSKY und LANGECKER). Die angeführten Zahlen sind Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

In einer Serie wurde auch der Harn direkt durch Einbinden einer Kanüle in den Ureter gewonnen. Die Frösche waren dabei vorher mit Curarinsulfat für 5 Std bewegungsunfähig gemacht worden. Bemerkenswert war die große Flüssigkeitsmenge in der Bauchhöhle, die beim Eröffnen derselben abfloß. Nicht jedes Präparat war für die Harngewinnung geeignet, da häufig eine Anurie auftrat.

Versuchsergebnisse.

1. Der Gehalt des Froschplasmas an endogenem Kreatinin beträgt 1,05 mg-% $\pm$ *0,16 (Mittelwert mit mittlerer Abweichung von 15 Fröschen) (Februar 1944).*

2. Bestimmung der Clearance am intakten Frosch mit Hilfe des endogenen Kreatinins (Februar 1944); Mittelwert von 13 Versuchen auf 100 g Frosch bezogen.

	1. halbe Stunde	2. halbe Stunde	3. halbe Stunde	4. halbe Stunde
Harnmenge (cm³) . . .	0,81 ± 0,22	0,78 ± 0,13	0,65 ± 0,06	0,64 ± 0,13
Filtrat (cm³)	0,95 ± 0,22	0,85 ± 0,13	0,73 ± 0,07	0,83 ± 0,30
U/P mg-%	1,35 ± 0,48	1,13 ± 0,37	1,11 ± 0,20	1,33 ± 0,38

Nach diesen Befunden hat es den Anschein, daß eine Wassersekretion vorhanden ist, da in einer Reihe von Versuchen das Verhältnis *U/P* mg-% kleiner als 1 ist. Um die Schwankungen der Filtratgrößen bei den einzelnen Tieren besser zu sehen, seien dieselben von 8 Versuchstieren der ersten beiden halben Stunden angeführt. Sämtliche Werte sind auf 100 g Froschgewicht bezogen.

Frosch	1. halbe Stunde		2. halbe Stunde		Anmerkung
	Harnmenge cm³	Filtrat cm³	Harnmenge cm³	Filtrat cm³	
1	0,88	0,92	0,97	1,05	
2	0,82	0,72	0,87	0,82	Wassersekretion
2	1,00	1,39	0,68	0,80	
4	1,00	0,83	0,68	0,80	Wassersekretion in der 1. halben Stunde
5	0,88	0,86	0,78	0,73	Wassersekretion
6	0,35	0,75	0,67	0,75	
7	0,93	1,12	0,92	1,07	
8	0,68	1,01	0,63	0,83	

3. Bestimmung der Filtratgröße am curarisierten Frosch mit Hilfe des endogenen Kreatinins. Der Harn wurde mittels einer in den Ureter eingebundenen Glaskanüle gewonnen. Mittelwerte aus 10 Versuchen (Februar 1944) auf 100 g Frosch bezogen.

Harnmenge cm³/Std	*U/P* mg-%	Clearance cm³/Std
0,40 ± 0,2	3,7 ± 1,8	1,1 ± 0,62

Das Verhältnis *U/P* mg-% ist hier viel höher als beim normalen nicht operierten Frosch, in einem Falle betrug es 7,1. Dieser Konzentrierungsfaktor ist beim Ganztier nie erreicht worden. Die Diurese ist durch Curarinsulfat gehemmt. Diese Wirkung ist auch an der isoliert durchströmten Froschniere beobachtet worden.

4. Bestimmung der Clearance am intakten Frosch mittels Cyanols. 27 Versuche (2. 11.—4. 4. 44). Mittelwerte auf 100 g Frosch bezogen.

Plasma mg-%	Harn mg-%	*U/P* mg-%	Harnmenge cm³/Std	Clearance cm³/Std
7,09 ± 1,59	6,83 ± 3,08	1,26 ± 0,50	1,03 ± 0,43	$1{,}2^{0} \pm 0{,}3_{7}$

Das Cyanol wird in demselben Maße wie das endogene Kreatinin konzentriert. In dieser Versuchsserie wurde auch eine Wassersekretion festgestellt.

5. Bestimmung der Clearance des exogenen Kreatinins. 10 Versuche (1.—24. 4. 44.) Mittelwerte auf 100 g Frosch bezogen.

Plasma mg-%	Harn mg-%	*U/P* mg-%	Harnmenge cm³/min	Clearance cm³/min
8 32,4 ± 5,02	51,36 ± 27,86	1.57 ± 0,68	0,026 ± 0,021	0,031 ± 0,0014
			cm³/Std	cm³/Std
			1,55 ± 1,28	1,89 ± 0,89

6. Bestimmung der Clearance des exogenen Kreatinins und Inulins. 6 Versuche.

	Plasma mg-%	Harn mg-%	*U/P* mg-%	Harnmenge cm³/min	Clearance cm³/min
Kreatinin	119,9 ± 33,0	117,8 ± 26,7	1,035 ± 0,454	0,30 ± 0,014	0,03 ± 0,01
				cm³ je ³/₄ Std	cm³/Std
				1,77 ± 0,82	1,63 ± 0,61
					cm³/min
Inulin .	381,0 ± 68,0	454,0 ± 86,4	1,19 ± 0,43		0,032 ± 0,015
					cm³/Std
					1,90 ± 0,94

In dieser Versuchsserie konnte gezeigt werden, daß das exogene Kreatinin rückresorbiert werden kann, wenn der Plasmaspiegel desselben sehr hoch liegt. Bei einem Plasmaspiegel bis zu 40 mg-% sind die errechneten Clearances mit den durch Inulin bestimmten fast identisch. In zahlreichen Versuchen konnte aber festgestellt werden, daß das Kreatinin auch in den geringeren Konzentrationen manchmal rückresorbiert werden kann. Doch zeigen manche Versuche mit hohen Kreatininplasmawerten Clearancewerte (Versuch 20. 6. 44), die gleich groß sind wie bei der Inulin-Clearance. In den Versuchsserien wurde immer eine Reihe von Fröschen gefunden, die Wasser sezernierten, obwohl die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Es scheint, daß die Wassersekretion nervös-reflektorisch stark beeinflußt werden kann. Bei einer ganzen Reihe von Tieren wurde z. B. nach dem Katheterisieren eine Diuresehemmung festgestellt. An einem Versuchsbeispiel soll dies gezeigt werden.

Versuch: 20. 6. 44. Die Werte auf 100 g Frosch bezogen.

	Plasma mg-%	Harn mg-%	U/P mg-%	Harnmenge cm³/Std	Clearance cm³/Std
Inulin	378,0	236,0	0,675	2,016	1,356
Kreatinin	92,7	62,1	0,669		1,35

nach einer halben Stunde wurde der Frosch nochmals katheterisiert:

Inulin	378,0	570,0	1,51	0,924	1,392
Kreatinin	93,0	147,0	1,51		1,392

7. Bestimmung der Clearance des Inulins. Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, daß in einer Versuchsserie mit hohem, in einer anderen mit einem niedrigeren Inulinplasmaspiegel gearbeitet wurde. In beiden Versuchsserien waren die Clearancewerte gleich groß, obgleich die Versuche nach einem Intervall von 20 Tagen ausgeführt wurden und die Tiere in einer anderen Reaktionslage waren.

Versuche vom 31. 5. 44 (8 Versuchstiere).

Inulin		U/P	Harnmenge	Clearance
Plasma mg-%	Harn mg-%	mg-%	cm³/min	cm³/min
343,0 ± 76,2	332,0 ± 128,8	0,968 ± 0,282	0,037 ± 0,016	0,334 ± 0,011
			cm³/Std	cm³/Std
			2,20 ± 0,93	2,00 ± 0,64

Versuche am 20. 6. 44 (7 Versuchstiere).

Inulin		U/P	Harnmenge	Clearance
Plasma mg-%	Harn mg-%	mg-%	cm³/min	cm³/min
12,47 ± 2,82	13,95 ± 1,44	1,182 ± 0,252	0,028 ± 0,016	0,0343 ± 0,016
			cm³/Std	cm³/Std
			1,68 ± 0,96	2,06 ± 0,97

Besprechung der Ergebnisse.

Der endogene Kreatininspiegel zeigte in den ausgeführten Versuchen eine sehr geringe Schwankungsbreite. Die Cyanol-Clearance hat ungefähr dieselbe Größenordnung wie die bei der isoliert durchströmten Niere gefundene. Das Inulin zeigt auch ähnliche Werte wie sie Liang beim Durchströmungspräparat mit Hilfe einer Inulin-Ringerlösung gefunden hat. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Konzentrierungsfaktor für die Filtrationstestsubstanzen, wie Kreatinin, Cyanol, Ferrocyannatrium, Xylose und Inulin bei der isoliert durchströmten

Froschniere fast identisch mit dem am intakten Tier gefundenen ist. Doch wurde beim Vergleich von gleichzeitig bestimmter exogener Kreatinin- und Inulin-Clearance in einigen Fällen Rückresorption von Kreatinin festgestellt. Eine Sekretion von Kreatinin konnte in den vorliegenden Versuchen nicht beobachtet werden (auf Grund der Inulin-Clearance). Beim Vergleich mit der isolierten Niere (Shoji und Takeda[11]) sieht man, daß die Tubuli der intakten Nieren undurchlässig für Kreatinin sind, während die der überlebenden (absterbenden) Niere durchlässig werden. Aus diesem Grund wurde eine Diffusion von Kreatinin beim isoliert durchströmten Nierenpräparat beobachtet (Schmengler[12], Robbins[13], Höber[14]). Es tritt dabei mit geringerer oder gleicher Konzentration wie in der Durchströmungsflüssigkeit auf. Als Ursache für diese Erscheinung wurde eine Asphyxie des Tubulusapparates angenommen (Shoji und Takeda[11]). Die in den vorliegenden Versuchen gefundene Rückresorption von exogenem Kreatinin kann vielleicht als eine Zwangsrückresorption (vgl. dieselbe beim Hund nach Atropingabe, Kuschinsky und Langecker[4]) aufgefaßt werden, da der Kreatininspiegel im Plasma ziemlich hoch lag. In anderen Versuchen wieder konnte eine gute Übereinstimmung mit der Inulin-Clearance gefunden werden. Besonders der angeführte Versuch bei gleichzeitig bestimmter Kreatinin- und Inulinclearance zeigt, wie gut beide Filtratbestimmungen übereinstimmen können. Die Wassersekretion ist hierbei besonders augenscheinlich. Es kann angenommen werden, daß diese unter ganz bestimmten Bedingungen auftritt. Durch die Kathetereinführung wurde sie sofort aufgehoben. Dies wurde an einer ganzen Reihe von Versuchen festgestellt. Auch unter dem Mikroskop (beobachtet mit Hilfe des Intravital-Mikroskops nach Ellinger und Hirt der C. Zeiß-Werke in Jena) kann beim Berühren des Ureters eine Durchblutungsänderung der einzelnen Nierenabschnitte gesehen werden. Beim Vergleich der vom intakten Frosch produzierten Harnmengen mit denen beim Hund, auf dasselbe Körpergewicht bezogen, fällt auf, daß sie fast gleich groß sind. Nur die Zusammensetzung und die Clearance ist dabei verschieden. Beim Säugetier ist daher die Entscheidung, ob eine Substanz sezerniert oder durch verminderte Rückresorption ausgeschieden wird, schwieriger.

Die Filtration ist beim Warmblüter als eine sehr konstante Größe der Nierenfunktion festgestellt worden und auch beim Frosch konnte dies durch die angeführten Versuche gezeigt werden. Nur ist sie entsprechend der geringen Anzahl der Glomeruli kleiner als beim Warmblüter.

Am operierten mit Curarin behandelten Frosch tritt eine Diuresehemmung auf, wobei das U/P mg%-Verhältnis des endogenen Kreatinins besonders hoch ist. Die Diuresehemmung ist auch an der isoliert durchströmten Froschniere nach Curaringabe beobachtet worden. Das

Curarin oder Reizung des Ureters (reflektorische Diuresehemmung) verursacht eine erhöhte Rückresorption von Wasser.

Zusammenfassung.

1. Die U/P mg-%-Verhältnisse beim endogenen, exogenen Kreatinin, Cyanol und Inulin sind von derselben Größenordnung.

2. Die Werte der U/P mg-%-Verhältnisse (Cyanol, Kreatinin und Inulin) entsprechen denen, die bei der isolierten Froschniere gefunden wurden.

3. Einige Befunde sprechen dafür, daß die Froschniere Wasser sezernieren kann.

4. Am operierten und curarisierten Frosch ist das U/P mg%-Verhältnis viel höher, als beim normalen Tier. Weiter wird mehr Wasser rückresorbiert.

5. Die Wassersekretion wird leicht reflektorisch beeinflußt.

Literatur.

[1] Volhard, F.: Bergmann-Staehelins Handbuch der inneren Medizin, Bd. 6. 1931. — [2] Ellinger, P., u. A. Hirt: Arch. exper. Path. (D.) **145**, 193 (1929). — [3] Frey, E.: Klin. Wschr. **1937**, 284. — [4] Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 718 (1947). — [5] Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 710 (1947). — [6] Folin, O., and H. Wu: J. biol. chem. (Am.) **38**, 98 (1919). — [7] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939). — [8] Alving, A. S., J. Rubin and B. F. Miller: J. biol. chem. (Am.) **127**, 609 (1939). — [9] Kühn: Laboratoriumsbedarf, Frankfurt a. M. — [10] Liang, T. J.: Pflügers Arch. **228**, 271 (1929). — [11] Shoji, T., u. K. Takeda: Tohoku J. exper. Med. (Jap.) **26**, 592 (1935). — [12] Schmengler, E. F., u. R. Höber: Pflügers Arch. **233**, 199 (1934). — [13] Robbins, S. S., u. M. S. Wilhelm: Pflügers Arch. **232**, 66 (1933). — [14] Höber, R.: Pflügers Arch. **230**, 327 (1932).

Dr. R. Hotovy, Heidelberg, Pharmakologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 594—608 (1949).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer).

Über die O_2-Atmung menschlichen Knochenmarks, Blutes und Serums*.

Von

Joachim Pirwitz.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. April 1949.)

Die Physiologie des Knochenmarks ist bisher fast nur aus der Betrachtung morphologischer Zustände und deren Veränderungen erschlossen worden. Es versprach daher der Versuch, mit der Methode Warburgs den Stoffwechsel des Knochenmarks zu messen, lohnende Ergebnisse. Als erste haben Felix, Hink und Grasmück den Sauerstoffverbrauch überlebenden Kaninchenmarks gemessen. Warren versuchte die Atemgrößen von Kaninchenknochenmark zu dessen Zellbild in Beziehung zu setzen und fand, daß bei normalen erwachsenen Tieren die Atemgröße des Knochenmarks und dessen Gehalt an myeloiden Zellen übereinstimmen und bei diesen starke Granulation mit Erhöhung der Atmung einhergeht.

Beim Menschen wandten zuerst Schretzenmayr und Bröcheler die Warburgsche Methode zur Messung der Knochenmarksatmung an. Die Verwendung dieses Untersuchungsverfahrens hat gerade beim Menschen Vorteile, da bei ihm durch wiederholte Sternalpunktion Mark unter den verschiedensten Bedingungen entnommen werden kann. Bei ihren Versuchen betrug der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch normalen Knochenmarks 18 mm^3 je Kubikzentimeter und Stunde. Die Atmung ist bei sekundärer Anämie stark gesteigert, nicht gesteigert bei unbehandelter perniziöser Anämie, um unter Leberbehandlung stark anzuwachsen. Bei einem Kranken mit lymphatischer Leukämie mit 400000 Lymphozyten im Kubikzentimeter peripheren Blutes wurde keine Steigerung gefunden.

Michelazzi sah beim Meerschweinchenknochenmark, was Morawitz beim peripheren Blut des Menschen entdeckt hatte: Nach Blutentzug steigt während der Regeneration der Sauerstoffverbrauch auf das 2—3fache, wenn die Tiere erst nach 2—3 Tagen getötet werden. Bei früherer Tötung ist er unverändert; nach oft und lange Zeit wiederholtem Blutentzug sinkt oder steigt die Atmung.

Orr stellt die Atmung des Knochenmarks der von Tumorgewebe gleich, während Warren — die Atmung des Markes in Ringerlösung

* Herrn Prof. H. E. Bock danke ich für die Anregung der Arbeit und sein Interesse an ihrem Verlauf.

und Serum vergleichend — zeigte, daß die Stoffwechseleigenschaften von Tumorgeweben nur in Ringerlösung bestehen, in arteigenem Serum dagegen verschwinden.

H. E. Bock fand, daß der O_2-Verbrauch des Knochenmarks im wesentlichen durch Ausmaß und Tätigkeit des Erythroblastenapparates bestimmt wird, daß aber auch die Leukopoese nicht belanglos ist und einen erheblichen oder sogar ausschlaggebenden Einfluß auf den O_2-Verbrauch haben kann. Er kam zu dem Schluß, daß nicht das morphologische und quantitative Moment, sondern das funktionelle Geschehen im Mark die Größe des O_2-Verbrauchs bestimmt.

Im Anschluß an die Versuche H. E. Bocks und K. Felixs wird in dieser Arbeit versucht, ihre Befunde an normalem und pathologischem Mark zu erweitern, die Unabhängigkeit der Atemgröße von morphologischen Befunden nachzuprüfen und die Art der Regelung der Atemgröße des Marks zu ermitteln.

Vorgehen.

Die Versuche wurden unter Beachtung der Bedingungen, die Krebs in seiner Arbeit über die Methodik des Warburgapparates angibt, angesetzt. Als gerinnungshemmendes Mittel diente in allen Fällen 3,8%iges Natrium citricum, nachdem sich gezeigt hatte, daß es ebensowenig wie andere gerinnungshemmende Mittel (Liquaemin, Hirudin, Vetren) die Atmungsgröße beeinflußt. Ferner wurden, um eine Konstanz der Ionisierung zu erreichen, 7% einer auf $p_H = 7{,}34$ gepufferten isotonischen Lösung von primärem und sekundärem Natriumphosphat zugesetzt. Die Sauerstoffverbrauchswerte wurden unter Abrechnung aller Zusätze für 1 cm^3 atmende Menge (Sternalpunktat, peripheres Blut, Plasma oder Serum) angegeben. Bei Versuchen mit Knochenmark ist es besonders schwierig wegen der Mischung der verschiedensten Zellformen, deren Raumanteil nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann, sowie der im Einzelfall unkontrollierbaren Menge mitaufgesogenen peripheren Blutes eine Bezugsgröße für die Atmung zu finden. Diese Schwierigkeit beherrscht alle obengenannten Arbeiten. In der Mehrzahl der Fälle begnügt man sich mit der Angabe in Kubikzentimeter, die aus den angeführten Gründen erhebliche Fehlerquellen mit sich bringt. Eben deshalb ist auch die von Warburg für die Atmung normalen Gewebes angewandte Bezugsgröße des Trockengewichts für Knochenmark nicht günstig verwendbar. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, haben H. E. Bock und K. Felix den Gehalt des jeweils atmenden Knochenmarks an Purinstickstoff gemessen und damit ein Maß für den Anteil an kernhaltigen Zellen gefunden. Trotzdem sind auch hierbei noch Ungenauigkeiten denkbar, weil die Konzentration des Purinstickstoffs nicht in allen Kernen gleichmäßig zu sein braucht, oder wenn man annimmt, daß die Atmungsgröße einer humoralen

Regelung unterliegt, die die einzelnen Zellformen jeweils verschieden stark beeinflußt. Wir haben in unseren Versuchen, obwohl jedes der eben geschilderten Verfahren, eine Bezugsgröße zu finden, bisher mit erheblichen Fehlerquellen behaftet ist, die atmenden Mengen unter Abrechnung aller Zusätze in Kubikzentimeter angegeben.

Da unsere Versuche immer 2 Std dauerten, wurden die Werte der 1. und der 2. Std angegeben. Es interessierte ferner, wie stark sich in diesen 2 Std die Atmung abschwächt, denn, wie später gezeigt werden

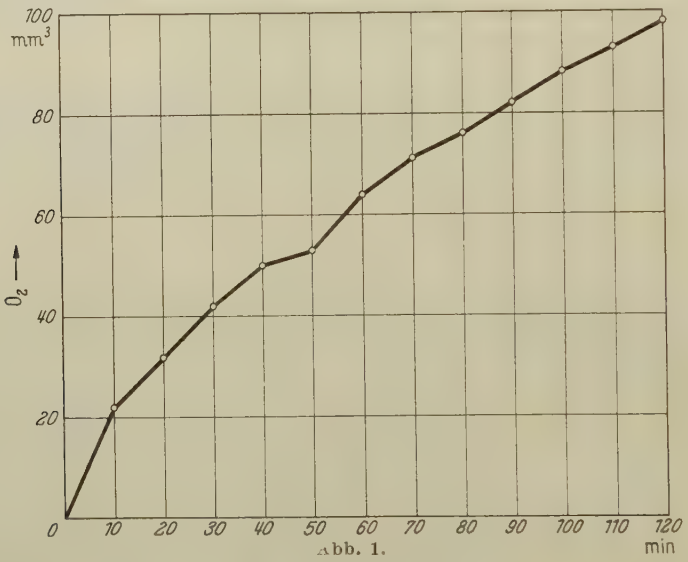


Abb. 1.

soll, erfolgt im Lauf der Zeit eine Abschwächung der Atmung, die bei verschiedenen Versuchsansätzen ganz verschieden groß sein kann. Es wurde deshalb immer der Quotient 1.: 2. Std berechnet.

Bei einer Verzögerung beim Ansetzen der Versuche muß nach dem eben Gesagten die Atmung schwächer sein als bei sofortigem Ansetzen. Diese Abschwächung wird besonders deutlich bei Blut und Plasma, kann aber auch beim Knochenmark bedeutsam werden. Um den Einfluß des Luftsauerstoffs möglichst auszuschalten, wurde sofort nach jeder Punktion das Punktat mit Paraffin überschichtet. Die Zeit zwischen Punktion und Beginn des Versuchs wurde in jedem Falle vermerkt, sie beträgt bei uns fast immer 50 min, die zum Zentrifugieren, Sättigung der Versuchsgefäße mit Sauerstoff, Temperaturangleichung und Ansatz der Versuche gebraucht wurden. Aus dem Verlauf der Atemkurven kann auch auf die Größe der Atmung von der Punktion an näherungsweise rückgeschlossen werden. Die Versuchstemperatur betrug in allen Fällen dauernd 38°.

Auf eine Tatsache, die wahrscheinlich viele Abweichungen der verschiedenen Angaben über die Atmungsgröße von Blut und Knochenmark verschuldet, soll hingewiesen werden: Die üblichen Versuchsmengen sind auch bei kräftigem Durchschütteln zu groß, um in ihrer Gesamtheit gleichmäßig zu atmen. Obwohl gefunden wurde, daß schon bei Überschreitung von 0,2 cm^3 die Atmung verschiedenen Präparaten verschieden stark ausfallen kann, wurde in den hier beschriebenen Versuchen in fast allen Fällen 0,8—1 cm^3 angesetzt. Die Atmung einer solchen Menge ist fast immer groß genug, um die unvermeidlichen Fehler der Ablesung unwesentlich zu machen, doch ist die Atemgröße noch entscheidend von der Menge abhängig. Es wäre zu empfehlen, sich bei künftigen Versuchen mit Blut oder Knochenmark ebenfalls dieser Mengen zu bedienen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Versuche.

Die Atmung des Knochenmarks Gesunder wurde an 7 Studenten im Alter von 19—21 Jahren ermittelt. Keiner von ihnen hat in letzter Zeit eine ernstere Erkrankung durchgemacht. Die Ergebnisse zeigten folgende Tabelle.

Die Kurve (Abb. 1) zeigt den Durchschnittswert der in der Tabelle 1 angeführten Einzelversuche. Aus ihr geht hervor, daß der Sauerstoffverbrauch in der 1. Std 64, in der 2. Std 34 mm^3 beträgt. Der Quotient 1.: 2. Std beträgt im Mittel 1,88.

Tabelle 1.

Name	O_2-Verbrauch in mm^3		1.:2. Std	R:W	Erythropoetische Reifungszahl	Myeloische Zellen: Gesamt weiße	Granulopoetische Reifungszahl	Retikulo im Sternum	Retikulo im Blut	Hämoglobin im Blut	Retikulo Sternum / Retikulo Blut	Erythrozyten im Blut
	1. Std	2. Std						‰	‰	%		Mill.
K. W.	92	52	1,77	52:100	194	94:100	268	33	7	106	4,7	5,7
L. H.	86	28	3,07	37:100	183	90:100	272	23	7	117	3,3	5,96
H. H.	81	35	2,31	33:100	207	93:100	280	44	4	99	11,0	5,34
W. F.	62	42	1,48	37:100	189	88:100	266	29	4	97	7,3	5,73
E. St.	55	41	1,34	39:100	183	89:100	258	29	11	117	2,6	6,04
O. K.	51	30	1,70	25:100	184	88:100	252	15	4	96	3,8	5,82
H. Ho.	20	14	1,43	32:100	214	93:100	262	23	9	110	2,5	5,64
Mittelwerte	63,9	34,57	1,87	36:100	194	91:100	265	28	7	106	4,0	5,73

Erythropoetische und granulopoetische Reifungszahl wurde nach H. E. Bock, Klin. Wschr. 1939 Nr 50, 1565 bestimmt.

Es bedeuten: a = O_2-Verbrauch in der 1. Stunde, b = O_2-Verbrauch in der 2. Stunde.

R : W-Verhältnis von roten Vorstufen zu weißen Zellen im Myelogramm.

Ta-

Name	Alter Jahre	Diagnose	O_2-Verbrauch in mm³ 1. Std	2. Std	1.:2. Std
K. K.	20	Myeloische Leukämie	417	210	1,98
M. B.	61	Lymphatische Leukämie	332	191	1,74
K. M.	60	Lymphatische Leukämie	212	171	1,24
A. Br.		Myeloblastose (akut)	132	137	0,96
W. Sch.	33	Hämolytischer Ikterus	132	111	1,19
W. Sch.	33	Hämolytischer Ikterus, Milzexstirpation	105	60	1,74
A. B.	49	Myeloische Leukämie	130	82	1,58
A. Br.	31	Myeloblastose (akut)	132	137	2,51
J. L.		Myeloblastenleukämie 5 Std vor dem Tode (akut)	24	7	3,43
Mittelwerte			169	110	1,82

Der Verlauf ist so, daß nach relativ steilem Anstieg eine allmähliche Abflachung der Kurve beginnt, die je nach dem Punktat in 5—8 Std in eine Waagerechte übergeht. Dargestellt sind nur die ersten beiden Stunden. Überraschend ist die sehr große Streuungsbreite, die gemessen wurde, obwohl sich bei keiner der Versuchspersonen im Markausstrichbild und bei den Blutwerten — trotz erheblicher persönlicher Unterschiede — ins Pathologische gehörende Abweichungen von der Norm finden.

Die Tabelle 1 zeigt, daß keine sichere Beziehung zwischen dem Markbild und der Atmungsgröße aufzustellen ist, wenn man nicht das Überwiegen der erythropoetischen Zellen als Ursache des sehr hohen Sauerstoffverbrauches bei K. W. vermuten oder den abnorm niedrigen O_2-Verbrauch bei H. Ho. mit der Reifungshemmung der Erythropoese (Zahl 214) und dem ungünstigen Verhältnis Retikulozyten im Sternum: Blutretikulozyten (2,5) in Beziehung bringen will.

Bei Blutkrankheiten fanden sich folgende Werte:

Tabelle 2 zeigt, daß bei unseren Versuchen mit chronischen Leukämien die Durchschnittsatmung immer wesentlich überschritten wurde. Bei A. Br., einer Myeloblastose des Marks, liegt die 1. und 2. Punktion 3 Tage auseinander. Die Kranke kam 2 Tage nach der 2. Punktion ad exitum. Auch hier lassen sich in keinem Falle aus dem Markbild Schlüsse auf die Atemgröße ziehen. Die Streuungsbreite ist außerordentlich groß. Bei J. L. einer Myeloblastenleukämie, die 5 Std vor dem Tode punktiert wurde und auch morphologisch ein durch Mikromyeloblasten besonders stark verändertes Mark hatte, war die Atmung außerordentlich gering. Bei A. Br. und J. L. findet sich in beiden Fällen vor

belle 2.

R:W	Erythropoetische Reifungszahl	Myeloische Zellen: Gesamtwert	Granulopoetische Reifungszahl	Hämoglobin %	Erythrozyten Mill.	Leukozyten	Retikulo Sternum ‰	Retikulo Blut ‰	Retikulo Sternum / Retikulo Blut
5,5:100	165	97:100	433	65	3,1	130000	—	34	—
7,5:100	135	13:100	228	52	4,1	336000	36	8	4,5
2:100	185	11:100	194	68	3,62	193000	107	12	8,9
10,5:100	191	94:100	380	43	1,7	2000	31	12	2,58
120:100	216	92:100	287	86	4,68	—	141	52	2,5
21,5:100	258	97:100	253	84	4,68	—	16	10	1,6
41:100	185	96:100	326	91	4,9	30000	43	29	1,48
16,5:100	223	85:100	515	35	1,8	3000	31	12	2,58
0	0	32:100	418	21	1,1	900	3	1	3
24,9:100	173	68:100	377	60	3,33	99270	51	17	3

dem Tode eine herabgesetzte Atmung. Bei dem Kranken mit hämolytischem Ikterus sinkt nach der Milzexstirpation die Atmung deutlich ab.

Die Atemwerte bei verschiedenen Kranken sind in Tabelle 3 [S. 600, 601) dargestellt. Hier zeigt sich, daß bei Krankheiten, bei denen die Sauerstoffsättigung des Blutes erschwert ist, die Atmungswerte über dem Durchschnitt liegen (offenes Herzseptum, Pulmonalstenose, Doppelpneu), eine Erscheinung, die aber nicht regelmäßig zu sein braucht (s. A. W.). Ferner scheinen Zustände toxischer Erkrankung (A. St., K. H., K. R.), niedrige Atemwerte zur Folge zu haben. Ebenso hatte die Kranke mit Myxödem unterdurchschnittliche Atemwerte.

Aus den gezeigten Tabellen geht hervor, daß wir zwischen Ausstrichbild und Atemgröße bei Knochenmark keine klaren Beziehungen finden konnten. Es fällt aber auf, daß die höchsten Werte des Sauerstoffverbrauchs bei chronischen lymphatischen und chronischen myeloischen Leukämien gemessen wurden, Werte, die bei den verschiedenen anderen Krankheiten nicht erreicht wurden. Man kann zusammenfassend feststellen:

1. Schon das Mark Gesunder zeigt Differenzen in der Atmung, die bis 400% betragen können, obwohl Abweichungen dieses Grades im prozentualen Markausstrichbild nicht gefunden wurden.

2. Bei den verschiedensten Krankheiten ist der Zusammenhang zwischen Erkrankungsart und der Atmungsgröße des Knochenmarks noch nicht so weit festgestellt, daß eine bestimmte Atmungsgröße vorauszusagen wäre. Kranke mit chronischem Sauerstoffhunger und lebhafter Regeneration haben hohen O_2-Verbrauch, während herabgesetzte

Ta-

Name	Alter Jahre	Diagnose	O_2-Verbrauch in mm³ 1. Std	O_2-Verbrauch in mm³ 2. Std	1.:2. Std
H. M.	34	Offenes Herzseptum	217	152	1,43
F. R.	17	Blutverlust 2,51 p. part.	210	173	1,21
A. N.	28	Leukopenie	195	143	1,36
E. T.	49	Anämie, Hirntumor	173	108	1,60
A. M.	28	Doppel-Pneu	162	80	2,02
M. Sch.	16	Pulmonalstenose.	132	48	2,27
K. E.	22	Röteln	104	36	2,89
F. Sch.	37	Verätzung, starker Ikterus, Temperatur 41°.	92	76	2,21
A. W.	58	Mitralinsuffizienz, stark dekompensiert	86	33	2,61

Stoffwechselleistungen bei Myxödem z. B. auch niedrige Markatmung aufweisen.

3. Der Quotient 1.:2. Std, den man als Ausdruck für den Grad der Atmung in der Zeiteinheit auffassen kann, hat keine Abhängigkeit von der endgültigen Atemgröße.

Es kann also allein durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs nie ein Rückschluß auf das Überwiegen bestimmter Zellformen im Knochenmark gezogen werden, obwohl im normalen Knochenmark eine oberflächliche Beziehung zwischen dessen erythropoetischer Funktion und der Atemgröße zu bestehen scheint. Ausgesprochen hohe Werte sprechen für eine Überproduktion der Erythro- oder Granulo- oder Lymphopoese im Mark, wobei Überproduktion der weißen Zellreihen bei unseren Versuchen wesentlich höheren O_2-Verbrauch hatten als Überproduktion der Erythropoesezellen.

Blut.

PFLÜGER hat zuerst auf die geringe Sauerstoffzehrung des peripheren Blutes hingewiesen. WARBURG hat als erster eingehende Versuche mit der Atmung normaler Erythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung angestellt. Er fand, daß die Atmung an das Vorhandensein von Strukturelementen gebunden ist, daß also das Stroma der Erythrozyten ein wesentlicher Träger der Atmung ist, und daß hämolysierte Erythrozyten, beidenen das Stroma nicht vollständig zerstört worden ist, etwa die gleiche Atmung haben wie normale. Von anderen Gesichtspunkten aus prüfte MORAWITZ die Zusammenhänge der Blutatmung mit der Blutneubildung und wies nach, daß die Atemgröße im wesentlichen von dem Anteil jugendlicher Zellen im Blut abhängig ist, d. h. daß das Blut von Anämikern, sobald es sich in starker Regeneration befindet, also etwa nach großen akuten

belle 3.

R.: W.	Erythropoetische Reifungszahl	Myeloische Zellen: Gesamtwert	Granulopoetische Reifungszahl	Hämoglobin %	Erythrozyten Mill.	Leukozyten	Retikulo Sternum ‰	Retikulo Blut ‰	Retikulo Sternum / Retikulo Blut
56:100	191	54,5:100	315	118	5,91	6700	187	7	26,7
46,5:100	170	91,5:100	299	84	4,32	—	45	16	2,8
40:100	180	83:100	322	84	4,88	3300	36	11	3,2
34,5:100	152	85:100	282	53	4,6	6300	36	8	4,5
29,5:100	160	95:100	284	92	5,25	—	38	5	7,6
106:100	211	74,5:100	176	131	6,75	—	35	10	3,5
36,5:100	178	92,5:100	279	125	5,12	15900	—	—	—
11,5:100	158	86:100	280	110	5,68	17250	45	15	3,0
16:100	154	87.5:100	249	90	5,8	7900	45	20	2,25

Blutverlusten, die größte Sauerstoffzehrung hat. Er warf damals die Frage nach dem Faktor, der für diese Atemsteigerung verantwortlich sein könnte, auf und nahm an, daß es sich um chemische Veränderungen der Erythrozyten handeln müßte. Masing fand auch, daß im Blut anämischer Tiere ein Parallelismus bestehe „zwischen dem numerischen Verhalten von Jugendformen und dem Verhalten von Phosphatiden und Nukleinsäuren". Damit scheint nahegelegt, daß in jungen Erythrozyten Kernfragmente für die Atmungssteigerung verantwortlich gemacht werden können. Ishibashi und Itami stellten fest, daß die Atemgröße parallel mit der Retikulozytenzahl anstieg. Rössingh fand keinen strengen Parallelismus, ist aber auch der Meinung, daß die Atmungssteigerung des Blutes ein Ausdruck erhöhter Regeneration sei.

Entsprechend diesem Grundsatz, daß die Atemgröße ein Maßstab für die Blutmauserung sei, sah Hansen auch bei der Schwangerschaft eine Steigerung der Blutatmung.

Interessant waren später die Befunde von Batelli und Stern, denen es gelang, durch Hinzufügung von Organextrakten eine Steigerung der Blutatmung zu erzielen, die bei Leberextrakten am größten war. Bei anderen Organextrakten zeigten sich sehr verschiedene Werte. Einen neuen Gesichtspunkt wiesen die Arbeiten Damblés auf, der die Steigerung der Atmung durch Leberextrakte eingehend prüfte und dabei sah, daß der Sauerstoffverbrauch von Anämikerblut bei schwacher Regeneration nur gering durch Zusatz von Leberextrakt gesteigert wurde, während bei starker Regeneration der Zusatz die Steigerung vervielfachte.

Unsere Versuche mit peripherem Blut sollten die Versuchsergebnisse der eben besprochenen Arbeiten teilweise nachprüfen, vor allem aber ergründen, ob Beziehungen zwischen Blut- und Knochenmarksatmung

bestünden, und ob sich ein Beweis für oder gegen eine humorale Regelung der Blutatemgröße finden ließe. Wir setzten daher eine ganze Reihe von Warburgversuchen an, bei denen gleichzeitig Sternalpunktat, peripheres Blut und Plasma atmeten. Es wurde zur genauen Kennzeichnung des Augenblickszustandes gleichzeitig das Ausstrichsbild des Markes und ein gesamter Blutstatus gemacht (Hämoglobin, Erythrozyten, Leukozyten, Erythrozytendurchmesser, Retikulozyten). Da WARBURG seine Versuche in der Hauptsache mit in Ringerlösung oder physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Erythrozyten angestellt hatte, soll geprüft werden, ob sich die im eigenen Plasma befindlichen Erythrozyten anders verhielten. Die Untersuchungen ergaben. daß im Normalblut sich die Atmung von Erythrozyten + eigenem Plasma nicht

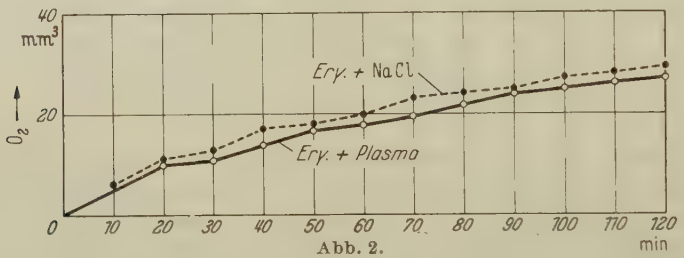


Abb. 2.

wesentlich von der von Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung unterscheidet (Abb. 2).

Weiter, daß weder Hämoglobinwert noch Leukozytengehalt noch die Erythrozytengröße eine regelmäßige Beziehung erkennen lassen, daß aber zwischen Retikulozytenzahl und Atemgröße innerhalb einer erheblichen Fehlerbreite nach oben und unten Beziehungen vorhanden sind (Abb. 3).

Die Beziehung zwischen Knochenmarks- und Blutatmung soll an Hand einiger Beispiele gezeigt werden. Tabelle 4 zeigt, daß zwischen Knochenmark und peripherem Blut eine ziemlich deutliche Beziehung der Atemgröße besteht. Sie wird am deutlichsten, wenn man allein die Werte der 1. Std berücksichtigt. Aus dieser Tatsache muß auf einen gemeinsamen humoralen Faktor geschlossen werden, da jeweils Flüssigkeiten von ganz verschiedenem Zellgehalt (Blut etwa 5 Millionen, Mark 150000—200000 Zellen je Kubikzentimeter) angesetzt wurden, durch diesen also die Größe der Atmung nicht allein bestimmt werden konnte.

Die Annahme eines gemeinsamen humoralen Faktors, der die Atmung von Blut und Knochenmark beeinflußt, steht im Einklang mit dem Befund von H. E. BOCK, daß für die Atemgröße des Knochenmarks dessen Funktionszustand maßgebend sei.

Die Atmung von Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung ist durch Arbeiten von WARBURG und MORAWITZ bekannt geworden. Wir setzten nun Versuche an, die den Sauerstoffverbrauch von Serum

und Plasma maßen. Es zeigte sich, daß beides einen Sauerstoffverbrauch hat, der wesentlich größer ist als der physikalische Absorptionsquotient

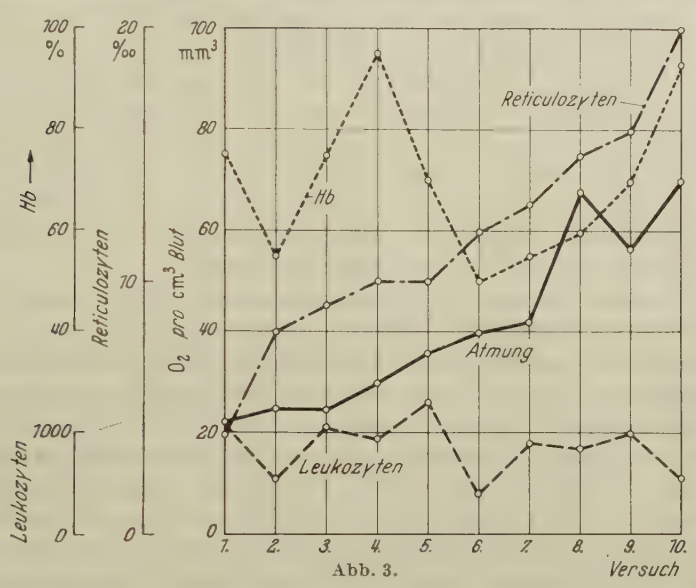


Abb. 3.

für O_2, und zwar ist diese Sauerstoffzehrung nur in den ersten 2 Std nach der Entnahme nachweisbar. Ob gleichzeitig CO_2 produziert wird.

Tabelle 4.

Name	Alter	Atmungswerte des Knochenmarks			Atmungswerte des Blutes			Diagnose
	Jahre	1. Std	2. Std	1.:2. Std	1. Std	2. Std	1.:2. Std	
K. H.	35	41	25	1,64	25	4	6,25	Urämie
A. St.	25	48	18	2,57	49	9	5,44	Urämie
M. B.	61	332	191	1,74	272	180	1,51	Lymphatische Leukämie
A. M.	64	442	167	2,64	212	171	1,24	Lymphatische Leukämie
E. T.	49	173	108	1,60	57	17	3,35	Unklare Anämie
K. K.	20	417	210	1,98	45	134	1,83	Myeloische Leukämie
F. Sch.	27	92	76	1,21	59	47	1,26	Verätzung, Ikterus
F. V.	41	47	27	1,74	24	10	1,41	Myxödem

wurde nicht nachgeprüft. Die Größe des Sauerstoffverbrauchs stand in keiner eindeutigen Beziehung zur Atmung des dazugehörigen Knochenmarks oder Blutes. Der O_2-Verbrauch des Serums war meist wenig, aber nicht gesetzmäßig niedriger als der des Plasmas. Wurde das Blut

sofort nach der Entnahme mit Paraffin überschichtet, und das durch Zentrifugierung gewonnene Plasma unter weiterem Paraffinabschluß einige Stunden aufbewahrt, so hat es die gleiche Fähigkeit O_2 zu binden wie frisches Plasma. Der Sauerstoffverbrauch bei 80 Versuchen mit Plasma aus Blut mit normalen Werten (Gesunde und Kranke) lag zwischen 8 und 24 mm^3 je Kubikzentimeter in 2 Std, bei 70 von diesen 80 Versuchen zwischen 12 und 16 mm^3 in 2 Std. Auch in schwer pathologischen Fällen, z. B. den oben angeführten Blutkrankheiten, wurden nie Werte über 24 mm^3 gesehen. Dabei wurde der Hauptteil des Sauerstoffs in der 1. Std verbraucht, der Quotient 1. : 2. Std ist also sehr hoch und liegt im Mittel bei 5,68.

Der Sauerstoffverbrauch des Plasmas kann durch Zusatz von Methylenblau oder Leberextrakten gesteigert werden. Selbst sehr geringe Konzentrationen von Methylenblau (1:100) bewirken gelegentlich hohe Steigerungen, in anderen Fällen war die Steigerung kaum merkbar. Gleichfalls unregelmäßig im Ausmaß war die Steigerung bei Zusatz von geringen Mengen Leberextrakt (Campolon). Ferner fand eine Steigerung des O_2-Verbrauchs bei Zusatz von geringen Mengen von Tierkohle statt. Auch hier war sie in keinem Fall sicher vorauszubestimmen. Einzelne Versuche mit Plasma hatten einen um mehr als das dreifache gesteigerten O_2-Verbrauch nach Zusatz von einem der drei genannten Stoffe, während andere bei Zusatz von geringen Mengen nicht oder kaum gesteigert wurden. Auch die „Eigenatmung" des Campolons wird durch Zusatz geringer Mengen Plasmas gesteigert. Hier ist, wie in den vorhergehenden Versuchen die Steigerung nicht regelmäßig zu finden. Von welchen Faktoren die O_2-Verbrauchssteigerung bei diesen verschiedenen Mischungen abhängig ist, konnte nicht gefunden werden. Es zeigte sich aber, daß Plasma von Diabetikern mit hohem Blutzuckerspiegel sich nicht anders verhielt als das von Gesunden.

Es wurden nun Versuche angesetzt, in denen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschene Erythrozyten aus Normalblut mit Plasma aus Blut von Kranken mit hohen Retikulozytenzahlen gemischt wurden. Es zeigte sich, daß in jedem Falle eine Steigerung der Atmung stattfand, die nicht so stark war wie die Atmung des retikulozytenreichen Originalblutes selbst, aber in jedem Fall eine mehr als 30%ige Steigerung der Atmung der Normalerythrozyten bedeutete.

Aus dieser Zusammenstellung wird klar, daß im Plasma stark regenerierenden Blutes ein Faktor vorhanden sein muß, der die Erythrozytenatmung steigert. Über die chemische Struktur dieses Faktors kann nichts Näheres gesagt werden, auch nicht über sein zeitliches Auftreten nach Aderlässen. Wir entnahmen bei großen Aderlässen nach je 100 cm^3 abgelassenem Blut eine Probe und setzten das Plasma in der oben beschriebenen Weise mit Normalerythrozyten an. Es ergab sich keine Differenz in der Wirkung des vor, während und nach dem Aderlaß

Tabelle 5.

Name	Atmung des Normalblutes	Plasma aus Blut mit		Atmung von normalen Erythrozyten + Plasma aus retikuloreichem Blut
		Retikulozyten %	Hämoglobin %	
Th. + E. M.	19	42	60	29 = + 53%
E. L. + F. T.	16	31	56	37 = + 250%
H. S. + G. F.	23	49	61	56 = + 143%
R. I. + E. R.	25	29	45	33 = + 80%
B. R. + N. B.	12	36	56	51 = + 325%

gewonnenen Plasmas. Es erfolgte am 2. Tage nach dem Aderlaß in beiden von uns geprüften Fällen eine geringe, fast noch im Rahmen der Fehlerquelle liegende Steigerung, von der nicht gesagt werden kann, ob sie auf die Wirkung dieses Faktors zurückzuführen ist, zumal sich in beiden Fällen nur Retikulozytenzahlen von 13 und 17‰ befanden.

Die atemsteigernde Funktion dieses im Plasma vorhandenen Faktors scheint sich nicht nur auf unzerstörte Erythrozyten zu beschränken, es wurde gleichzeitig auch Leberextrakt und Muskelgewebe in der Atmung gesteigert.

Oben erwähnte Arbeiten (Roessingh) haben gezeigt, daß die Blutatmung in ihrer Größe — bei erheblicher Fehlerbreite — von der Retikulozytenzahl abhängig ist. Es war nun wünschenswert, eine Methode zu finden, die erlaubte, die atemsteigernde Wirkung des Plasmas nicht nur an Erythrozyten zu prüfen, die jeweils von ganz verschiedenen Kranken gewonnen werden müssen und damit keinen einheitlichen Vergleichsmaßstab bieten. Es wurde daher, ausgehend von der Überlegung, daß in den Erythrozyten im wesentlichen das Stroma atmet, von großen Blutmengen Stroma durch Zentrifugieren und Auswaschen gewonnen, bei 60° getrocknet und im Mörser noch einmal pulverisiert. Es entstand ein bräunliches Pulver ohne Wasserbeimengung (Gewichtskonstanz nach mehrstündigem Trocknen bei 100°). Wurden 100 mg dieses Pulvers in einem Kubikzentimeter normalen Plasmas gelöst, so hatte diese Mischung eine Eigenatmung, die um ein Geringes höher war als die des Plasmas. Sie schwankte zwischen 20 und 24 mm^3 in 2 Std. Plasma aus retikulozytenreichem Blut hatte bei dieser Versuchsanordnung eine Atmungssteigerung, die — innerhalb erheblicher Streuungsbreite — proportional dem Retikulozytengehalt war (Tabelle 6). Sie zeigt, daß mit Anwachsen der Retikulozytenzahl auch eine Steigerung der Atmung des Plasma-Stroma-Gemisches eintritt, die nicht ganz sicher den Retikulozytenzahlen entspricht. Gerade darum stellt diese Versuchsanordnung ein willkommenes Verfahren zur Messung der Wirkung dieses atmungssteigernden Faktors dar. Ob diese Methode für alle Fälle von starker Regeneration gültig ist, wurde noch nicht geprüft. Es wurden beispielsweise keine leberbehandelten perniziösen Anämien während der Retikulozytenkrise untersucht.

Die Tatsache, daß in jedem geprüften Falle von starker Regeneration und Retikulozytenausschwemmung im Plasma ein Faktor auftritt, der eine Steigerung der Atmung von Normalerythrozyten bewirkt, ließ die Vermutung aufkommen, daß dieser Faktor eine gewisse funktionelle Beteiligung bei der Regeneration selbst haben könnte. Wir spritzten daher bei therapieresistenten Anämikern bisher 15mal je 50 cm³ Plasma von Kranken, die an Polyzythämie litten, oder als Perniziosakranke sich in starker Regeneration nach Lebertherapie befanden oder Blutungsanämien, die hohe Retikulozytenzahlen aufwiesen. Die Menge von 50 cm³ wurde willkürlich bei dem ersten Versuch angewandt und später, da sie sich als praktisch erwiesen hatte, beibehalten. 12 von diesen 15 Fällen zeigten erhebliche Steigerung der Retikulozytenzahlen und

Tabelle 6.

Plasma von Blut, in dem Retikulozyten ‰	Sauerstoffverbrauch bei 1 cm³ Plasma + 100 mg Erystroma
26	42
32	58
35	61
43	69
43	76

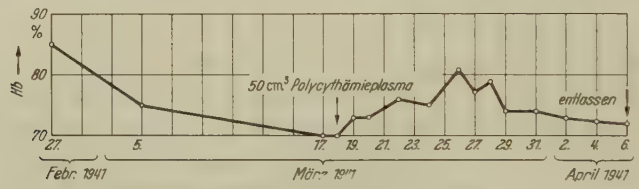


Abb. 4.

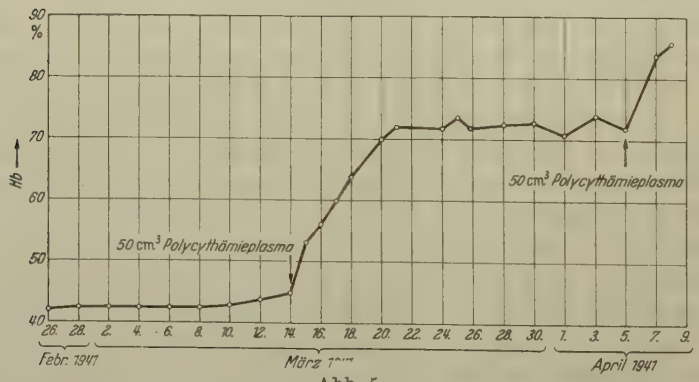


Abb. 5.

Anstieg des Hämoglobins. Diese Wirkung wurde bei weiteren Injektionen in gleicher Stärke wieder erreicht. Ohne Wirkung blieb die Injektion in einem Fall von myeloischer Leukämie mit niedrigen Hämoglobinwerten, einem zweiten mit einer durch Sulfapyridintherapie bedingten Anämie und einem dritten mit aplastischer Anämie nach starkem Blutverlust. Allerdings war in 2 von diesen 3 Fällen das Plasma

über 4 Std lang der Luft ausgesetzt. Auffällig ist, daß die 3 nichtreagierenden Kranken Männer waren, während bei allen injizierten Frauen eine Wirkung eintrat. Aus den geschilderten Versuchen werden 3 zusammen 8mal injizierte Fälle herausgegriffen, von denen 2 mit Eisen vorbehandelt waren ohne erkennbare therapeutische Wirkung, während der dritte seit 2 Jahren und auch während des Klinikaufenthaltes keine Eisenpräparate erhalten hatte.

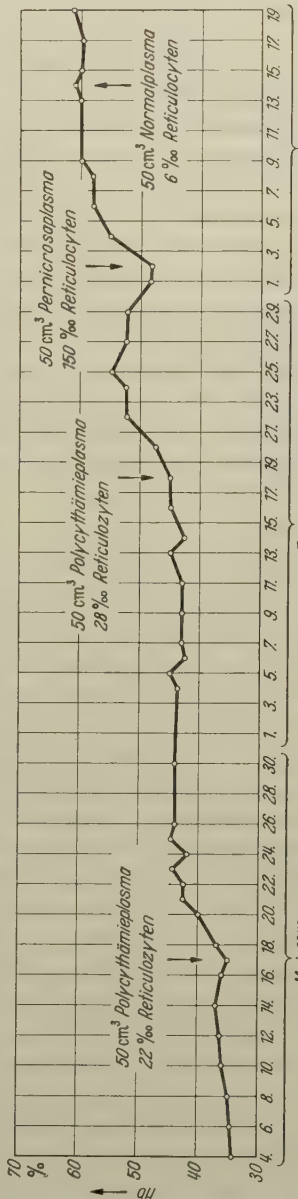


Abb. 6.

Abb. 4. M. H., 57jährige Frau mit seit Monaten anhaltendem Fieber unklarer Ätiologie wird mit 85% Hämoglobin eingeliefert, das im Verlauf der Allgemeinbehandlung trotz reichlicher Eisengaben (Ferrostabil) in 16 Tagen auf 70% abfiel. ↓ Hier die Plasmainjektion intravenös. Den Hämoglobingehalt nach Injektion zeigt die Kurve für jeden Tag. Die Kranke wurde später aus persönlichen Gründen ungeheilt entlassen und kam nach Monaten zur Sektion. Der Befund ergab eine abdominelle Lymphogranulomatose.

Abb. 5. B. H., 52jährige Frau. Früher nie ernstlich krank gewesen. In der Menopause reichliche Blutungen, seitdem Anämiebeschwerden. Der behandelnde Arzt fand laufend Werte um 40% Hämoglobin, die trotz reichlicher Ferrostabil- und Lebergaben nicht zu steigern waren. Deshalb Einlieferung in die Klinik. Hier ebenfalls mit Ferrostabil und Leber behandelt. In 16 Tagen kein Anstieg des Hämoglobins. Dann Plasmainjektion intravenös. Weiteren Verlauf siehe Kurve. Ein Vierteljahr nach der Entlassung abermalige Kontrolle. Das Hämoglobin war trotz zeitweiliger Eisenmedikation auf 64% herabgesunken. Abermalige Plasmainjektion. Nach 4 Monaten Kontrolle. Hämoglobin 92%. Seitdem bei 2 Nachkontrollen Werte zwischen 90 und 95%.

Abb. 6. K. K., 17jähriges Mädchen. Seit der Menarche mit 14 Jahren dauernd blutarm. Seit 2 Jahren keine Eisentherapie mehr. Wird mit 34% Hämoglobin eingewiesen. Keine Therapie. Nach 13 Tagen 36% Hämoglobin. Hier Plasmainjektion. Weiteren Verlauf siehe Kurve. Am 13. 7. mit 61% Hämoglobin die letzte Injektion. Anstieg auf 74%. Nach der Entlassung weiterer Anstieg. Nach 3 Monaten Kontrolle (hat in der Zwischenzeit keine Medikamente erhalten) Hämoglobin 96%.

Zusammenfassung.

Es wird in der Warburgapparatur die Sauerstoffzehrung von Blut, Knochenmark, Plasma und Serum bei Gesunden und Kranken gemessen. Beim Knochenmark und Blut finden sich erhebliche Verschiedenheiten der gemessenen Werte, die zu dem Ausstrichbild nicht in Beziehung zu setzen sind.

Überproduktion eines der 3 Zellsysteme des Blutes bewirkt eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs.

Zwischen der Atemgröße des Markes und der des Blutes besteht innerhalb weiter Grenzen eine Beziehung. Die bekannten Ergebnisse von Morawitz werden bestätigt.

Plasma und Serum haben einen Sauerstoffverbrauch, der ein Vielfaches des physikalischen Absorptionskoeffizienten für O_2 beträgt.

Plasma von stark regenerierendem Blut steigert die Atmung normaler Erythrozyten. Es wird ein humoraler Faktor vermutet, der bei der Steigerung der Erythropoese eine Rolle spielt. Deshalb wird Plasma von stark regenerierendem Blut therapieresistenten Anämikern injiziert. Es werden mit dieser Methode in der Arbeit beschriebene therapeutische Erfolge erreicht.

Literatur.

Batelli u. Stern: Biochem. Z. **21**, 487 (1909). — Bock, H. E.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1940**, 372. — Bock, H. E., u. K. Felix: Z. exper. Med. **107**, 169 (1940). — Damblé, K.: Z. exper. Med. **86**, 595, 608 (1933). — Denecke, G.: Z. exper. Med. **36**, 179 (1923). — Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1924**, 290. - Felix, K. A., Grassmück, K. Hink u. K. Matzen: Hoppe-Seylers Z. **221**, 137 (1933). — Hansen, R.: Klin. Wschr. **1938 I**, 521. — Ischibashi, S.: J. med. Coll. Keijo **9**, 1. — Itami: Arch. exper. Path. (D.) **62**, 93 (1910). — Masing: Arch. exper. Path. **66**, 71 (1911). — Michelazzi, L.: Arch. Fisiol. (It.) **38**, 101 (1938). — Morawitz, P., u. J. Pratt: Münch. med. Wschr. **1908**, Nr 35. - Orr, J. W., and B. H. Stickland: Biochem. J. (Brit.) **32**, 567 (1938). - Pflüger: Pflügers Arch. **10** (1875). - - Roessingh, M. J.: Dtsch. Arch. klin. Med. **138**, 367 (1938). - Schretzenmayr, H., u. H. Bröcheler: Klin. Wschr. **1936 II**, 998. – Warburg: Hope-Seylers Z. **59**, 112. - Warren jr., Ch. O.: Amer. J. Physiol. **110**, 61 (1934); **128**, 455 (1940).

J. Pirwitz, Freiburg i. Br., Medizinische Universitätsklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 609—624 (1949).

Aus dem Veterinär-Physiologischen Institut der Universität Leipzig.

Über die Wirkung kontaktinsektizider Stoffe auf das Zentralnervensystem einiger Kaltblüter.

Von

Friedrich Schwarz.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Mai 1949.)

Es ist bekannt, daß die neuen kontaktinsektiziden Mittel, die das Dichlordiphenyltrichlormethylmethan (DDT) als wirksame Komponente enthalten, auf Insekten eine zunächst Tremor und Krampf auslösende, später lähmende Wirkung haben (Läuger, Martin und Müller 1944). Ein analoges Vergiftungsbild findet man auch beim Warmblüter: Domenjoz (1944) beschreibt die Vergiftungserscheinungen bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen. Die Tiere werden zunächst unruhig und schreckhaft wie bei Strychninvergiftung und bekommen dann Tremor und tonisch-klonische Krämpfe. Cameron (1945) und Bishopp (1946) beschreiben die gleichen Erscheinungen. Velbinger (1947) berichtet über Vergiftungserscheinungen beim Menschen; sie bestanden in Sensibilitäts- und Gleichgewichtsstörungen, Benommenheitszuständen und Tremor in allen Gliedmaßen. Hoffmann und Lendle (1948) haben an Fischen, Kaulquappen und Fröschen Versuche angestellt und Symptome gefunden, die auf eine Beeinträchtigung des Zentralnervensystems wie bei den Warmblütern und analog zu den Vergiftungserscheinungen bei den Insekten schließen lassen.

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die kontaktinsektiziden Stoffe bei Insekten ebenso wie bei kalt- und warmblütigen Wirbeltieren offenbar auf Nerven*zentren* einwirken. Es ist möglich, daß bei den Insekten ein subepidermales Ganglienzellgeflecht, wie es Bethe (1896) und Tonner (1933) beim Flußkrebs gefunden haben, durch den kontaktinsektiziden Stoff gereizt und später gelähmt wird. Bei den Wirbeltieren wirken die kontaktinsektiziden Stoffe offenbar auf das Zentralnervensystem ein, sie machen Vergiftungsbilder, die an eine Störung in zentralen Teilen des extrapyramidalen Systems denken lassen. Aber auch eine Reizung und spätere Lähmung der Rückenmarkszentren kommt unter der Einwirkung kontaktinsektizider Stoffe zustande. Die tetanischen Krämpfe, die sich in einem bestimmten Stadium der Vergiftung durch mechanische Reizung der Tiere auslösen lassen, sprechen dafür, daß die insektiziden Stoffe auch auf die Strychninangriffspunkte im Rückenmark einwirken. Die auf die Krämpfe folgende

schlaffe Lähmung spricht für eine Ausschaltung der motorischen Wurzelzellen. Daß die kontaktinsektiziden Stoffe das Rückenmark angreifen, zeigen die Versuche von Hoffmann und Lendle (1948), die am dekapitierten Frosch dasselbe Vergiftungsbild wie am unverletzten Tier hervorrufen konnten.

Eigene Versuche hierzu ergaben folgendes Bild: Mit kontaktinsektiziden Stoffen vergiftete *Frösche* zeigten zunächst das Bild einer beginnenden Strychninvergiftung. Diese Erscheinungen gingen aber bald in intermittierende tonisch-klonische Krämpfe über, die mit athetotischen Bewegungen und Ruhepausen abwechselten. In den Ruhepausen lagen die Frösche flach auf dem Boden, sie schienen motorisch gelähmt zu sein. Nahm man einen vergifteten Frosch in diesem Stadium in die Hand, so machte er kraftlose Abwehr- und Fluchtbewegungen, die auf eine allgemeine Hypotonie schließen ließen. Der Frosch wird dekapitiert. Am spinalen Tier lassen sich merkwürdig „athetotische" Bewegungen und Kloni beobachten. Diese intermittierend und unberechenbar auftretenden Muskelkontraktionen verhinderten die Prüfung der Reflexe durch Kneifen, mit Essigsäure und durch faradischen Strom. Die Reflexe ließen sich wohl oft, aber nicht immer auslösen; es war aber ausgeschlossen, quantitative Beziehungen zwischen Reizstärke, Reflexzeit und Erfolg abzulesen. Es sah so aus, als ob das Gift unmittelbar in oder an den motorischen Vorderhornzellen und den Schaltneuronen angreife, einmal reizend und die Erregbarkeit steigernd, das andere Mal hemmend und lähmend wirke und als ob die einzelnen Ganglienzellen sich in untereinander ganz verschiedenen Stadien der Giftwirkung befänden.

Fische, die unter Giftwirkung standen, wurden zunächst unruhig, schwammen lebhaft, aber kaum wild — dazu fehlte die Kraft — umher und bekamen sehr bald Gleichgewichtsstörungen. Sie schwammen dann halb oder ganz auf der Seite, führten oft Wälzbewegungen aus und wurden beim ruhigen Liegen oder langsamen Schwimmen oft von Krämpfen befallen. Nahm man einen Fisch in diesem Stadium in die Hand, so machte er kraftlose Abwehrbewegungen. Schließlich lagen die Fische gelähmt auf dem Boden, wurden aber immer wieder in größeren oder kleineren Zeitabständen von schwachen Krämpfen geschüttelt.

Es ergibt sich also, daß die kontaktinsektiziden Stoffe auf das Zentralnervensystem einwirken, und es erhebt sich die Frage, ob sich diese Einwirkung messend verfolgen lasse. Eine Reizung oder Lähmung des Zentralnervensystems läßt sich durch elektrischen Strom, Gleich- und Wechselstrom, herbeiführen. Diese Stromwirkungen sind vor allem von Scheminzky und seinen Schülern (1936, 1939, 1940) untersucht worden und werden als Galvanonarkose, galvanischer und Wechselstromkrampf bezeichnet. Auch die Wirkung des Stromes auf das durch

zentral erregende oder lähmende Pharmaka beeinflußte Zentralnervensystem ist von SCHEMINZKY untersucht worden. Pharmakon und elektrischer Strom addieren sich gelegentlich in ihrer Wirkung. Es lag nahe, auch die Einwirkung der zentral angreifenden kontaktinsektiziden Stoffe mit Hilfe dieser elektrischen Methode zu untersuchen.

Für die hier beschriebenen Versuche wurden Frösche (Rana temporaria, Rana esculenta) von 20—50 g Gewicht und Fische (Karausche, Carassius vulgaris, und Moderlieschen, Leucaspius delineatus, 2 Kleinfische aus der Karpfenfamilie) von 4—6 cm Länge benutzt. Die Tiere wurden mit *Dichlordiphenyltrichlormethylmethan* (DDT) und mit *Difluordiphenyltrichlormethylmethan* (DFDT) vergiftet.

Methodik.

Nach den Angaben von HOFFMANN und LENDLE (1948) wurde der insektizide Stoff in heißem Alkohol gelöst, so daß eine 4%ige Lösung entstand. Unter Zusatz von 2 g Adhägon wurden 2,5 cm^3 der 4%igen Lösung mit destilliertem Wasser oder Ringerlösung auf 100 cm^3 verdünnt. Adhägon ist ein indifferenter Eiweißabbaustoff, der als Emulgator dient. In 1 cm^3 der fertigen Emulsion war 1 mg des insektiziden Stoffes enthalten. Die Emulsion wurde den Fröschen in die Bauchhöhle injiziert oder sie wurde in das Wasser gebracht, in dem die Fische umherschwammen.

Um die Krampf und Lähmung erzeugende Wirkung des Giftes quantitativ verfolgen zu können, wurde nach der von SCHEMINZKY und seinen Schülern (1936, 1939, 1940) erprobten Methode Galvanonarkose oder galvanischer Krampf hervorgerufen und die Stromstärke abgelesen, die zur Schwellenwirkung der Narkose oder des Krampfes nötig war. Die Frösche wurden *einzeln* in ein rechteckiges Glasgefäß gebracht, an dessen einander gegenüber liegenden Schmalseiten die Elektroden angebracht waren. Sie bestanden entweder aus Elektrodenkohle oder aus mit Mull umwickeltem Zinkblech. Die Messungen wurden in reinem Leitungswasser, das oft erneuert wurde, durchgeführt. Die Fische wurden für die Dauer der Messung, die etwa 10—30 sec beanspruchte, aus dem vergifteten Wasser herausgenommen. Es wurde jeweils nur *ein* Tier im Meßgefäß durchströmt.

Als Gleichstromquelle diente ein an das Wechselstromnetz angeschlossener Motorgenerator, der eine Spannung von 240 V erzeugte. Über eine Spannungsteilerschaltung mit Schieberrheostat wurde die Stromstärke variiert. Eine Elektrode war geerdet. Im nichtgeerdeten Zweig der Zuleitung befand sich ein Milliamperemeter.

Nach Einbringen des Fisches in die Durchströmungswanne wurde der Gleichstrom einschleichend verstärkt. Die Tiere sind anodisch galvanotaktisch, sie stellen sich von einer bestimmten Stromstärke an nach schnellem, heftigen Hin- und Herschwimmen längs zu den Stromlinien mit dem Kopf zur Anode hin ein, so daß sie „absteigend" durchströmt werden. Bei weiterer Verstärkung des Stromes hört die schlängelnde Bewegung des Leibes auf, die Tiere fallen auf die Seite und sinken unter, es tritt *Galvanonarkose* ein. Die Stromstärke, die hierzu nötig ist, wird abgelesen. Sie ändert sich mit dem durch die Vergiftung sich ändernden Zustand des Zentralnervensystems, wie SCHEMINZKY und seine Schüler gezeigt haben, die das Verfahren als *Stromdosisverfahren* bezeichnet haben.

Ein Frosch wird mit dem Kopf nach der Anode hin in die Durchströmungswanne gebracht und mit Glasgabeln in dieser Lage festgehalten. In der Wanne befindet sich Leitungswasser. Der Frosch taucht völlig unter. Nun wird der

Gleichstrom, von Null ausgehend, allmählich verstärkt. Das Tier wird unruhig, wird von Krampfstößen geschüttelt und bekommt schließlich in den Hinterextremitäten einen Streckkrampf. Dieser Zustand läßt sich vielleicht mit dem Exzitationsstadium einer chemischen Narkose vergleichen. Das Tier wird mit Hilfe der Glasgabeln in Rückenlage gebracht und der Strom wird so lange verstärkt, bis die Hinterextremitäten erschlaffen und das Tier schlaff und ohne Umdrehreflex im Wasser liegt. Die hierzu nötige Stromstärke wird abgelesen. Folgen die Messungen in kürzeren Zeitabständen aufeinander, dann macht das Tier nur ein schwaches Exzitationsstadium durch, man bringt es gleich in Rückenlage und narkotisiert den Umdrehreflex hinweg. Dies gilt auch für Tiere, die unter der Giftwirkung des insektiziden Stoffes stehen.

In einer anderen Versuchsreihe wurde der Frosch mit dem Kopf nach der Kathode gewendet in die Meßwanne gebracht und „aufsteigend" durchströmt. Bei einer relativ niedrigen Stromstärke bekam das Tier Streckkrämpfe in den Hinterextremitäten. Es wurden die Schwellenstromstärken, die zur Auslösung dieses *galvanischen Krampfes* nötig sind, von Zeit zu Zeit am normalen und am vergifteten Tier gemessen.

In der gleichen Weise wurde mit Wechselstrom ein Krampf der hinteren Extremitäten erzeugt. Das Durchströmungsgefäß wurde über eine Spannungsteilerschaltun gan das Wechselstromnetz angeschlossen und der Frosch zu einer Elektrode hingewendet in die Wanne gebracht, so daß er also längs durchströmt wurde. Der Strom wurde einschleichend verstärkt und es wurde die Stromstärke abgelesen, bei der es zu einem Tetanus der Hinterextremitäten kam.

Werden Fische in das Gefäß gebracht, das mit Wechselstrom durchströmt wird, so stellen sie sich gewöhnlich nach wildem Hin- und Herschwimmen parallel zur Elektrodenfläche, also *quer* zu den Stromlinien ein. Man nennt dieses Verhalten *Oszillotaxis*. Von einer bestimmten Stromstärke an verharren die Tiere ruhig in dieser Haltung mit einem mehr oder minder feinschlägigen Tremor, der zeigt, daß die Körpermuskulatur sich im Krampf befindet und die Tiere sich in einem Stadium der *Fixation* befinden. An vergifteten und normalen Tieren wurde die Schwelle dieser Fixation bestimmt.

Versuche und Ergebnisse.

Es wurden Fische, (Karauschen und Moderlieschen) in gutem Kräftezustand aus dem Aquarium entnommen, einzeln in die Durchströmungswanne zur Messung der Galvanonarkoseschwelle gebracht und dann einzeln in 600 cm^3 einer wäßrigen Emulsion gebracht, die auf 100 cm^3 Wasser 1 mg DDT enthielt oder ähnlich zusammengesetzt war. In Tabelle 1 ist der Gehalt der Emulsion an insektiziden Stoffen angegeben. Ein Tier wurde nach der ersten Messung in 600 cm^3 Leitungswasser gebracht. In einigen Versuchen wurden Fische in Adhägon-Emulsion gebracht. Diese Tiere zeigten nie irgendwelche Reaktionen. Die Fische blieben 120 min in dem gifthaltigen Wasser und wurden dann in größere, 1—2 Liter fassende Gefäße, mit Leitungswasser gefüllt, umgesetzt. Das Wasser wurde regelmäßig erneuert. Die Tiere erhielten Futter, das sie allerdings während der Dauer der Vergiftungssymptome nicht annahmen. In größeren zeitlichen Abständen wurden die für die Galvanonarkose nötigen Schwellenstromstärken bestimmt.

In Tabelle 1 sind einige Versuche wiedergegeben. Die Schwellenstromdosis in mA gibt die Stromstärke des gesamten, durch die Meßwanne fließenden Stromes an. Die Berechnung der Stromdichte in δ (Scheminzky 1924) erübrigte sich, da es hier nur auf relative Werte, nämlich auf den Vergleich mit den Schwellenwerten des Kontrolltieres, ankam.

Fisch Nr. 115 (Tabelle 1), Kontrolltier. Die Schwellenstromstärken streuen um einen Mittelwert, der etwa bei 11 liegt. Sie liegen an manchen Tagen niedriger, an anderen höher, gelegentlich findet man auch eine tageszeitliche Schwankung.

Fisch Nr. 110. Die Schwellenwerte sinken ab; dabei schwimmt das Tier noch lebhaft umher, wird von Krämpfen geschüttelt; nimmt man es in die Hand, dann fühlt man die Kraftlosigkeit der Bewegungen; der Fisch läßt sich durch eine geringere Stromstärke in Narkose versetzen als normalerweise. Es ist dies eine Wirkung, wie sie Adler (1932) bei der Anwendung zentral lähmender Mittel gefunden hat. Die Wirkung des Pharmakons und des in absteigender Richtung fließenden Stroms addieren sich. Die abgesunkenen Schwellenstromstärken steigen zeitweise an, sinken wieder ab, um schließlich wieder normale Werte zu erreichen.

Die Giftwirkung war reversibel, der Fisch hat die unmittelbare Vergiftung mit dem DDT überstanden. Dies schließt nicht aus, daß das Tier später an einer Folgekrankheit der Vergiftung doch noch zugrunde geht, sei es, daß vielleicht durch die Vergiftung ein Organschaden gesetzt worden ist, sei es, daß das Tier während oder nach der manifesten Vergiftung für irgendwelche andere Krankheiten anfälliger geworden ist.

Adler (1932) achtete darauf, daß die von ihm verwendeten Pharmaka keine chemische Narkose herbeiführten, daß also ihre Wirkung unterschwellig blieb. Dabei beobachtete er eine Senkung der Schwelle der Galvanonarkose, die von äußerlich an den Tieren sichtbaren Symptomen nicht begleitet war. In den hier beschriebenen Versuchen ist es anders. Die Fische bekommen Gleichgewichtsstörungen und klonische Krämpfe, die gleichzeitig mit der Senkung der Galvanonarkoseschwelle auftreten. Das Problem liegt hier zunächst anders. Es gilt der Frage nachzugehen: wie wirkt überhaupt der kontaktinsektizide Stoff auf das Zentralnervensystem? Das Stromdosisverfahren gestattet hierzu quantitative Angaben (wie aus dem Folgenden noch hervorgehen wird), die bei bloßer Beschreibung der Vergiftungssymptome nicht möglich sind.

Fisch Nr. 111 zeigt dieselben Erscheinungen wie der Fisch Nr. 110, mit dem Unterschied, daß die Vergiftungssymptome, sowohl die äußerlich sichtbaren, als auch die Schwellensenkung, später eintraten als bei Nr. 110.

Bei dem Fisch Nr. 111 kam es schon zu einer Senkung der Galvanonarkoseschwelle, als noch keine Gleichgewichtsstörungen und Krämpfe zu sehen waren. Zur Seitenlage kam es bei ihm erst am 2. März um 17 Uhr. Vorher schwamm das Tier normal, zeigte sich nur etwas unruhig. Die Konzentration des Giftes war hier nur halb so groß wie im vorhergehenden Versuch. Man sieht hier eine Möglichkeit, mit „unterschwelligen“ Dosen eine Änderung der Galvanonarkoseschwelle zu

erzielen, wie dies ADLER (1932) mit Narcotica erreicht hat. Wahrscheinlich eignen sich nicht alle Fische für solche Versuche. Die Fische richten sich am Ende der Giftwirkung aus der Seitenlage wieder auf, bevor die Schwelle der Galvanonarkose wieder normale Werte erreicht hat. Dies gilt für die meisten Fische, bei denen die Vergiftung reversibel war. Fisch Nr. 111 schwamm am 9. März früh wieder aufrecht (Fisch Nr. 110 richtete sich am 11. März gegen 15 Uhr auf); die Schwelle war dabei noch stark erniedrigt.

Fisch Nr. 112 zeigt die gleichen Vergiftungssymptome. Am 15. März begann er sich aufzurichten. Fisch Nr. 113 erlag der Vergiftung. Fisch Nr. 114 schwamm erst am 16. März wieder aufrecht, als auch die Schwelle der Galvanonarkose wieder normal war.

Alle in Tabelle 1 aufgeführten Fische zeigen am 8. März gegen 17 Uhr besonders hohe Schwellenwerte. Die Schwelle der Galvanonarkose schwankt während der Vergiftung, möglicherweise in einer bestimmten Folge, die noch besprochen werden wird. Zur gleichen Zeit hatte aber auch das Kontrolltier eine auffallend hohe Schwelle, so daß man vielleicht an atmosphärische Einflüsse denken könnte. Im Verlauf

Tabelle 1.

Versuchsreihe vom 1.—16. März 1949. Karauschen, 50—55 mm lang. Galvanonarkose. Aufenthalt im vergifteten Wasser: 120 min.

Fisch Nr. 110: 1 mg DDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration 10^{-5}).
Fisch Nr. 111: 1 mg DDT in 200 cm^3 Wasser (Konzentration 5 10^{-6}).
Fisch Nr. 112: 1 mg DFDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration 10^{-5}).
Fisch Nr. 113: 1 mg DFDT in 200 cm^3 Wasser (Konzentration 5 10^{-6}).
Fisch Nr. 114: 1 mg DDT in 100 cm^3 Wasser + 1 mg DFDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration einzeln 5 10^{-6}, zusammen 10^{-5}).
Fisch: Nr. 115: Kontrolltier in Leitungswasser.

Datum	Zeit	Nr. 110	Nr. 111	Nr. 112	Nr. 113	Nr. 114	Nr. 115
März	Uhr	Schwellenstromdosis in mA					
1.	9,25	13	14	12,5	14	12,5	12
	10,30	10,5	12	9	9,5	9	12
	11,20	9	13	8	10,5	9,5	12
	13,05	8	8	6	6,8	8	14
	14,40	6,5	10,5	5	6,5	6,8	14
	16,15	6,5	6	4,5	5,2	5,2	12,5
2.	9,00	4,3	4,5	3,9	3,6	4,7	11,2
	14,40	5,5	4,7	6,5	5	5,5	9,5
3.	9,50	6	5,3	6,7	6,5	5	8,5
	14,50	5	4,7	4,3	4,2	4,7	8,5
8.	8,30	6	5,7	5,6	0	3,9	8,7
	17,30	10	11	11,5	9	6,8	14,5
9.	8,35	7,2	6,2	6	0	2,5	8,4
	17,15	5	6	6,2	4,7	5	11,5
10.	9,35	4,2	5	6	0	1,2	9
11.	8,40	4,6	8	4,5	†	3,5	8,5
15.	8,45	8	4	4		5	9,7
16.	9,05	11,5	14	8		11,5	12

der Versuche fiel es auf, daß die Schwellenwerte der Galvanonarkose bei Fischen und Fröschen bei plötzlichem Wetterwechsel, z. B. Wintergewittern, stark schwankten.

Das DFDT hatte bei den Karauschen ungefähr dieselbe Wirkung wie das DDT, die Symptome schienen bei der Vergiftung mit DFDT früher aufzutreten als bei der Vergiftung mit DDT. Dies ließ sich auch an Moderlieschen beobachten.

Eine höchst merkwürdige Erscheinung zeigte sich bei vielen vergifteten Fischen, die in der Zeit von Januar bis März untersucht wurden: auf der Höhe der Vergiftung reagierten sie eindeutig *kathodisch galvanotaktisch*. Verstärkt man, von der Stromstärke Null ausgehend, allmählich den Strom, so werden die Fische, die zunächst ohne Willkürbewegung, von Zeit zu Zeit von Krämpfen geschüttelt, auf der Seite liegen, lebhaft, schwimmen umher und stellen sich mit dem Kopf zur Kathode hin ein, also umgekehrt, als es normale Tiere tun. Bei weiterer Verstärkung des Stromes wendeten sich einige Fische doch noch zur Anode, die anderen blieben in ihrer Lage und wurden durch galvanischen Krampf fixiert. Dreht man sie vor dem Erreichen der Schwelle für den galvanischen Krampf mit einem Glasstab um, so daß sie nun absteigend durchströmt werden, dann fallen sie in Galvanonarkose. Auf diese Art sind zum Teil die Schwellen in Tabelle 1 bestimmt worden. Eine solche *Umkehr der Galvanotaxis* bei *Fischen* ist meines Wissens bisher nicht bekannt.

Crozier (1926, 1927) beobachtete an Nemertinen, die normalerweise eine kathodische Galvanotaxis zeigen, bei Strychninvergiftung eine Umkehr in anodische Galvanotaxis und an Echiurus bei Strychninvergiftung eine Umkehr der anodischen in kathodische Galvanotaxis. Fries (1928) beobachtete an Plathelminthen und Anneliden bei Strychninvergiftung eine Umkehr der kathodischen in anodische Galvanotaxis, und Rose (1927) sah bei Gammarus pulex unter Einwirkung von Kohlensäure, Sauerstoff oder verschiedenen Elektrolyten und bei Änderung des p_H eine Umkehr der anodischen in kathodische Galvanotaxis.

Es sieht so aus, als ob die gelähmt oder hypotonisch auf der Seite liegenden Fische durch die Durchströmung in aufsteigender Richtung bei einer mittleren Stromstärke ihre richtige Tonisierung wiederbekämen. Sie schwimmen dann lebhafter und kraftvoller, und es sieht so aus, als ob die Fische diesen Zustand durch kathodisch-galvanotaktische Einstellung *suchten*. In der Erholungsphase, während die Galvanonarkoseschwelle wieder ansteigt, gewinnen die Fische ihre anodische Galvanotaxis wieder. Diese zweite Umkehr der Galvanotaxis tritt ein, wenn sich die Schwelle der Galvanonarkose nur noch wenig unter dem Normalwert befindet oder ihn eben erreicht hat. In dieser Phase kann das Tier noch Störungen in den Gleichgewichtsfunktionen zeigen.

Die vergifteten Fische zeigen nach recht kurzer Zeit Symptome einer Störung des Gleichgewichtsapparates, sie schwimmen auf die

Seite geneigt, führen später Wälzbewegungen aus und liegen bei höheren Graden der Vergiftung ganz auf der Seite. Aufgeschreckt schwimmen sie dann auch unter Beibehaltung der Seitenlage davon. Da die kontaktinsektiziden Stoffe auf das Zentralnervensystem einwirken, könnte man wohl per analogiam annehmen, daß die *Zentren* der Gleichgewichtsorgane gestört sind, daß etwa das Mittelhirngebiet, der Nucleus ruber und vielleicht die Synapsen im Verlauf des Tractus rubrospinalis unter Giftwirkung stehen. Das Zentralnervensystem der Fische scheint übrigens in dieser Beziehung noch nicht recht erforscht zu sein.

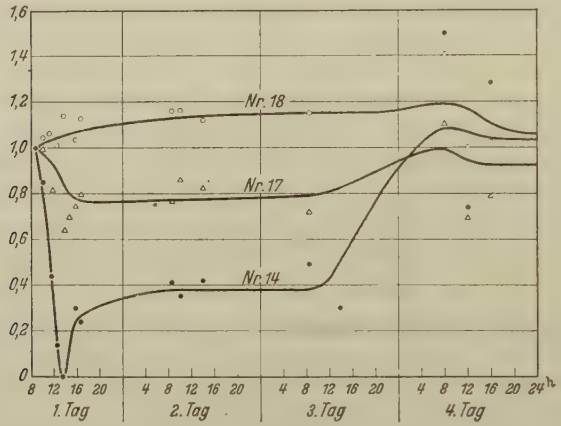


Abb. 1. Galvanonarkose am Frosch. Abszissen: Tageszeit. Ordinaten: Relative Galvanonarkoseschwellen (erste Messung am normalen Tier=1). Kurve Nr. 14 (schwarze Punkte): Schwellenwerte eines mit 0,5 mg DFDT vergifteten Frosches. Kurven Nr. 17 (weiße Dreiecke) und Nr. 18 (weiße Punkte): Schwellenwerte zweier Kontrolltiere.

Durch Injektion der gifthaltigen Emulsion in die Bauchhöhle wurden *Frösche* vergiftet. Bei diesen und bei mehreren Kontrolltieren wurden in größeren oder kleineren Zeitabständen die zur Galvanonarkose nötigen Schwellenstromstärken bestimmt. In Abb. 1 sind die Befunde bei einem vergifteten und 2 Kontrolltieren wiedergegeben.

Frosch Nr. 14 erhielt um 9 Uhr 0,5 mg DFDT injiziert. Während er übererregbar wie bei einer beginnenden Strychninvergiftung wurde, sanken die Galvanonarkoseschwellen ab. Gegen 13,40 Uhr war er vollständig gelähmt, zeigte keinen Umdrehreflex, durch Strom in absteigender Richtung war auch keine Exzitation hervorzurufen. Über den gelähmten Frosch liefen von Zeit zu Zeit Schüttelkrämpfe hin. Einige Stunden später war bei dem Tier ein leichter Exzitationszustand mit bei weiterer Stromverstärkung sich anschließender Galvanonarkose auszulösen. In Ruhe gelassen lag aber der Frosch so gelähmt wie vorher in seinem Glastrog und hatte ab und zu tonisch-klonische Krämpfe. In diesem Zustand verblieb der Frosch auch am zweiten Tag. In den Vormittagsstunden des dritten Tages zog der Frosch die Extremitäten wieder an und begann sich aufzurichten und wieder in der normalen Hockstellung dazusitzen. Gleichzeitig näherten sich auch die Schwellenwerte der Galvanonarkose dem Normalwert.

Die Stärke des Stromes (in mA), der durch die Wanne geschickt werden mußte, um eine Galvanonarkose hervorzurufen, war von Tier zu Tier verschieden. Um die Meßreihen besser vergleichen zu können und da es, wie bei den Fischversuchen, nur auf relative Werte ankam, wurde die erste am noch normalen Tier gemessene Galvanonarkoseschwelle gleich 1 gesetzt und alle folgenden Meßwerte wurden durch den der ersten Messung dividiert. So sind die Kurven der Abb. 1 zustande gekommen. Die Abszissen geben die Tageszeit, die Ordinaten die relativen Galvanonarkoseschwellen, bezogen auf den ersten gemessenen Normalwert gleich 1, an. Die Kurven Nr. 17 und 18 sind von 2 Kontrolltieren erhalten worden. Bei Nr. 17 lag der zuerst gemessene Wert (am ersten Tag 9 Uhr) zufällig recht hoch, so daß die Kurve im ganzen unter 1 liegt. Bei Nr. 18 war es umgekehrt. Man ersieht aus den Kurven recht gut den Spielraum der Normalwerte, von denen sich die Schwellenwerte der vergifteten Tiere deutlich unterscheiden müssen, wenn sie Beweiskraft haben sollen. Dies trifft für die Kurve Nr. 14 zu. Am 4. Tag wurden bei der Messung um 8 Uhr die Galvanonarkoseschwellenwerte aller 3 Frösche ungewöhnlich hoch gefunden. Hier halte ich wieder atmosphärische Einflüsse für die mögliche Ursache (zur gleichen Zeit Wintergewitter und Schneesturm im Februar 1949.)

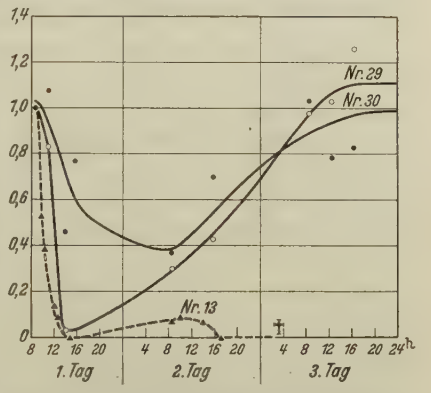


Abb. 2. Galvanonarkose am Frosch. Abszissen: Tageszeit. Ordinaten: Relative Galvanonarkoseschwellen (erste Messung am normalen Tier = 1). Kurve Nr. 29 (weiße Punkte): Schwellenwerte eines mit 0,4 mg DFDT vergifteten Frosches. Kurve Nr. 30 (schwarze Punkte): Schwellenwerte eines mit 0,2 mg DFDT vergifteten Frosches. Kurve Nr. 13 (schwarze Dreiecke): Schwellenwerte eines mit 0,5 mg DFDT vergifteten Frosches (Exitus).

Die Kurve Nr. 14 sinkt zunächst steil ab, der Frosch wird in wenigen Stunden völlig gelähmt. Dann steigt die Kurve wieder an und hält sich bis zum dritten Tag auf annähernd gleicher Höhe. Es sieht so aus, als ob das Gift zunächst schnell lähmend wirke, es dann aber zu Gegenmaßnahmen im vergifteten Organismus käme, die die vollständige Lähmung beseitigen und verhindern, bis es schließlich mit dem Ansteigen der Kurve zur Wiederherstellung des Tieres kommt.

In Abb. 2 sind die Befunde bei 3 vergifteten Tieren dargestellt worden (die Kurve des Kontrolltieres schwankte um 1 wie bereits erörtert). Frosch Nr. 29 erhielt 0,4 mg DFDT, Nr. 30 erhielt 0,2 mg DFDT. Es kommt wieder in den ersten Stunden zu einer Lähmung, die dieses Mal bei der schwächeren Dosierung nicht vollständig ist, und

anschließend zu einer allmählichen Restitution. Der Frosch Nr. 13 (der zur Versuchsreihe der Abb. 1 gehört), hat 0,5 mg DFDT erhalten. Es kommt zur vollständigen Lähmung wie bei Nr. 14. Am zweiten Tag werden Schwellenstromstärken gemessen, die auf eine geringgradige Erholung schließen lassen, doch sinkt die Kurve wieder ab und am dritten Tag tritt der Tod ein. Hier sieht es so aus, als ob nach der ersten vollständigen Lähmung Gegenmaßnahmen in Gang gekommen sind, die aber nicht ausreichten, so daß es wieder zur vollständigen Lähmung

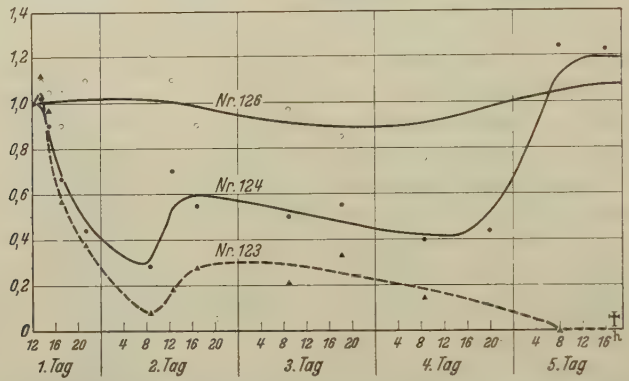


Abb. 3. Galvanonarkose an Fischen. Abszissen: Tageszeit. Ordinaten: Relative Galvanonarkoseschwellen (erste Messung am normalen Tier=1). Kurve Nr. 124 (schwarze Punkte): Schwellenwerte einer mit DDT (Konzentration 10^{-5}) vergifteten Karausche. Kurve Nr. 126 (weiße Punkte): Schwellenwerte eines Kontrolltieres. Kurve Nr. 123 (schwarze Dreiecke): Schwellenwerte einer mit DDT (Konzentration 10^{-5}) vergifteten Karausche (Exitus).

und schließlich zum Tode kam. Ein solcher Kurvenverlauf wurde des öfteren bei Fröschen beobachtet, auch wenn sie mit DDT vergiftet worden waren.

Während DDT und DFDT bei den für die Versuche benutzten Fischen ungefähr gleich toxisch wirkten, die Giftwirkung des DFDT eher noch schneller eintrat als die des DDT, waren die Frösche für DFDT deutlich weniger empfindlich als für DDT. Während auch geringe Dosen von DDT in den meisten Fällen zum Tode führten, kam es bei Vergiftungen mit DFDT oft zur Wiederherstellung. In kombinierten Gaben von DDT und DFDT scheinen die Gifte additiv zu wirken (Tabelle 1).

In Abb. 3 ist der Vergiftungsverlauf an 2 Fischen dargestellt worden. Fisch Nr. 124 wurde für 120 min in eine Emulsion gesetzt, die in 100 cm^3 Wasser 1 mg DDT enthielt. Auch an diesem Tier beobachtete man den Eintritt der Lähmung, dann eine schwache Besserung, als ob ein Gegenmechanismus in Gang käme, dann wieder eine Zunahme der Lähmung und schließlich doch Erholung: der Organismus ist mit der Vergiftung fertig geworden. Fisch Nr. 123 ist nur 60 min derselben Giftlösung

ausgesetzt worden, aber er hat entweder mehr Gift aufgenommen oder er ist weniger widerstandsfähig als Nr. 124. Man beobachtet nach der ersten Lähmung ein Wiederansteigen der Kurve, dann ist aber doch die toxische Wirkung stärker und am 5. Tag tritt der Tod ein. Fisch Nr. 126 ist das Kontrolltier.

Vergiftet man Frösche mit zentral lähmenden Mitteln und stellt die Schwellen für Galvanonarkose und galvanischen Krampf fest, so findet man nach den Angaben Scheminzkys (1938, 1940, 1941) eine Erniedrigung der Schwellenstromdosis für Galvanonarkose, eine Erhöhung für den galvanischen Krampf, man erhält also spiegelbildlich symmetrische Kurven. Es lag nahe, an ein ähnliches Verhalten der Schwellenkurven bei Vergiftung mit den zentral angreifenden kontaktinsektiziden Stoffen zu denken. Es wurden Frösche mit DDT und DFDT vergiftet, die Tiere mit dem Kopf nach der Kathode hin gewendet in die Durchströmungswanne gebracht und die Stromstärke bei Eintritt des Streckkrampfes in den Hinterextremitäten abgelesen. In Tabelle 2 sind die Befunde an 2 vergifteten und einem Kontrolltier wiedergegeben. Die Tiere zeigten alle Symptome der Vergiftung: Unruhe, tonisch-klonische Krämpfe, Lähmung. Bei Nr. 36 endete die Vergiftung tödlich, Nr. 38 erholte sich. Bei allen Tieren *bleibt* die *Schwelle* des *galvanischen Krampfes* während der Vergiftung *unverändert*. Bei vollständiger Lähmung ist schließlich der Krampf nicht mehr auszulösen, auch nicht bei erheblicher Steigerung der Stromstärke. Ob kurz vor dem Eintritt dieser vollständigen Lähmung die Krampfschwellen ansteigen, ließ sich nicht ermitteln. Ein solches Ansteigen müßte sehr kurzfristig vor sich gehen. Zu diesem Verhalten der Schwellenkurven — Absinken der

Tabelle 2.

Versuchsreihe vom 22.—24. Februar 1949. Eskulenten. Galvanischer Krampf. Durchströmung unter Wasser. Insektizider Stoff in die Bauchhöhle injiziert.
Frosch Nr. 36 (Gewicht: 38 g). 0,2 mg DDT.
Frosch Nr. 38 (Gewicht: 43 g). 0,2 mg DFDT.
Frosch Nr. 42 (Gewicht: 38 g). Kontrolltier.

Datum	Zeit	Nr. 36	Nr. 38	Nr. 42
	Uhr	Schwellenstromdosis in mA		
22.	9,00	17	18	16,5
	11,15	14	14	17
	13,55	15	14,5	14
	15,40	15	15,5	18,5
	21,35	†		
23.	8,30		16	21
	15,45		17	21
24.	8,40		14,4	17,5
	12,25		20	17,5
	16,15		20	19,5

Tabelle 3.

Versuchsreihe vom 22.—24. Februar 1949. Eskulenten. Wechselstromkrampf. Durchströmung unter Wasser. Insektizider Stoff in die Bauchhöhle injiziert.

Frosch Nr. 43 (Gewicht: 30 g). 0,4 mg DDT.
Frosch Nr. 44 (Gewicht: 31 g): 0,2 mg DDT.
Frosch Nr. 45 (Gewicht: 41 g): 0,4 mg DFDT.
Frosch Nr. 46 (Gewicht: 42 g): 0,2 mg DFDT.
Frosch Nr. 47 (Gewicht: 31 g): 0,2 mg DDT + 0,2 mg DFDT.
Frosch Nr. 50 (Gewicht: 37 g): Kontrolltier.

Datum	Zeit Uhr	Nr. 43	Nr. 44	Nr. 45	Nr. 46	Nr. 47	Nr. 50
		Schwellenstromdosis in mA					
22.	9,10	3,0	3,3	3,4	3,4	3,2	2,7
	11,20	3,5	3,5	3,1	2,7	3,2	2,8
	14,10	1,3	5,5	3,5	2,7	3,3	2,4
	15,50	1,4	12,0	4,5	2,8	2,9	2,6
23.	8,40	3,0	—	4,0	4,0	4,3	3,1
	15,50	5,5	—	5,7	3,5	4,8	3,9
	20,10		†				
24.	8,50	3,5		2,6	2,5	3,4	2,5
	12,35	—		6,6	2,8	4,3	3,0
	16,20	—		2,8	2,2	2,6	2,7
	18,40	†					

Galvanonarkoseschwelle bei gleichzeitigem Unverändertbleiben der Krampfschwelle — ist mir aus dem Schrifttum nur eine Mitteilung KÖLLENSPERGERs (1938) bekannt, der durch Gaben von Kongorot bei Fröschen eine Erhöhung der Schwellenstromdosis für den galvanischen Krampf erzielte, während die Galvanonarkoseschwelle unbeeinflußt blieb.

In einer anderen Versuchsreihe wurde ein *Wechselstromkrampf* in den Hinterextremitäten vergifteter Frösche hervorgerufen und das Verhalten der Schwellenstromstärke beobachtet. In Tabelle 3 ist eine solche Versuchsreihe wiedergegeben. Die Frösche Nr. 43—47, die mit DDT und DFDT vergiftet wurden, zeigen praktisch gleichbleibende Schwellen, wie das Kontrolltier Nr. 50 auch. Bei vollständiger Lähmung ist auch mit starken Strömen kein Krampf mehr auszulösen. Die Tiere Nr. 43 und 44 starben, während sich die anderen erholten. Bei dem Frosch Nr. 44 ließ sich kurz vor dem Einsetzen der vollständigen Lähmung noch eine Krampfmessung durchführen, die einen hohen Wert (12 mA) ergab.

In Tabelle 4 sind Wechselstrommessungen bei *Fischen* wiedergegeben. Der Krampf kam hier bei oszillotaktischer Einstellung der Fische quer zu den Stromlinien zustande. Auch hier findet sich praktisch keine Veränderung der Schwellen bis zum Eintritt des Todes oder bis zur Genesung.

Bei einigen vergifteten Fröschen ließ sich in einem Stadium, in dem sie völlig gelähmt dalagen, in dem aber noch ein Wechselstromkrampf

Tabelle 4.

Versuchsreihe vom 2.—9. März 1949. Karauschen, 50—55 mm lang. Wechselstromkrampf. Aufenthalt in vergiftetem Wasser: 150 min.

Fisch Nr. 116: 1 mg DDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration 10^{-5}).
Fisch Nr. 117: 1 mg DDT in 200 cm^3 Wasser (Konzentration $5 \cdot 10^{-6}$).
Fisch Nr. 118: 1 mg DFDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration 10^{-5}).
Fisch Nr. 119: 1 mg DFDT in 200 cm^3 Wasser (Konzentration $5 \cdot 10^{-6}$).
Fisch Nr. 120: 1 mg DDT in 100 cm^3 Wasser + 1 mg DFDT in 100 cm^3 Wasser (Konzentration einzeln $5 \cdot 10^{-6}$, zusammen 10^{-5}).
Fisch Nr. 121: Kontrolltier in Leitungswasser.

Datum	Zeit Uhr	Nr. 116	Nr. 117	Nr. 118	Nr. 119	Nr. 120	Nr. 121
		Schwellenstromdosis in mA					
2.	9,45	12	8,7	8,9	11,5	8,5	11,5
	11,00	10	10,5	11,7	11,7	12	12,2
	12,25	10,5	11	9	9,4	8	11,8
	14,55	9,3	9	9,5	8,5	9	11,6
3.	9,45	8,5	7,7	10	7,7	8,5	10,8
	14,55	7,5	7,2	7	6,8	7,2	9
4.	8,45	7,5	6,5	7,2	6,3	6,5	9
7.				†			
9.	14,20	7,5	†		†	†	7,5

auslösbar war, vor der eigentlichen Krampfschwelle eine schwächere Stromstärke ermitteln, bei der die Frösche Stoßbewegungen mit den Beinen ausführten und einen Muskeltonus zu haben schienen, der sich mehr dem normalen Tonus näherte.

In einem weiteren Stadium der Lähmung war mit der vorher gefundenen Schwellenstromstärke für den Wechselstromkrampf nur noch ein unvollständiger, von Phasen schlaffer Lähmung unterbrochener Tetanus auszulösen; eine Verstärkung des Stromes änderte daran nichts.

Im Schrifttum finde ich keine Mitteilung über Pharmaka, die eine Senkung der Galvanonarkoseschwelle bei gleichbleibender Wechselstromkrampfschwelle bewirken. Adler (1938) beobachtet bei Gaben von zentral lähmenden Mitteln eine vorübergehende Erhöhung der Wechselstromkrampfschwelle.

Der Befund, daß die kontaktinsektiziden Stoffe Krämpfe und Lähmungen auslösen, zeigt, daß sie an der Motorik angreifen. Klonische Krämpfe, athetotische Bewegungen, Gleichgewichtsstörungen weisen auf Angriffspunkte im Mittelhirngebiet hin. Intermittierende tonisch-klonische Krämpfe, athetotisch aussehende Bewegungen vergifteter dekapitierter Frösche zeigen aber, daß die Gifte auch die spinale Motorik angreifen und dabei Mittelhirnsymptome nachahmen können.

Eine Vergiftung mit DDT und DFDT lähmt den Strychninkrampf, auch am dekapitierten Tier. An einem mit kontaktinsektiziden Stoffen vergifteten Frosch läßt sich kein Strychnintetanus hervorrufen, es kommt

nach Injektion von Strychnin nur zu fibrillären Zuckungen oder kurzen Tetani einzelner Muskelfaserzüge, z. B. der Bauchmuskeln. Dies spricht dafür, daß die kontaktinsektiziden Stoffe an den motorischen Wurzelzellen, vielleicht auch an den Synapsen mit den Schaltneuronen angreifen. Ein weiter in der Peripherie liegender Angriffspunkt ließ sich durch Versuche an Nerv-Muskelpräparaten mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Schließlich wird durch die Vergiftung mit DDT und DFDT die Schwelle der Galvanonarkose erniedrigt. Nach den Versuchen SCHEMINZKYs (1939) werden aber Galvanonarkose und galvanischer Krampf im Rückenmark ausgelöst. Einige orientierende Versuche an vergifteten großhirnlosen und spinalen Fröschen scheinen die Befunde an unverletzten Tieren zu bestätigen.

SCHEMINZKY (1940) hat auf Grund der spiegelbildlich symmetrischen Beeinflussung der Galvanonarkose und des galvanischen Krampfes durch Pharmaka den Begriff der funktionellen Polarität geprägt. Aus dem Befund, daß durch die DDT-Vergiftung die Galvanonarkoseschwelle gesenkt, die Krampfschwelle aber nicht erhöht wird, könnte man schließen, daß die funktionelle Ausrichtung im Zentralnervensystem irgendwie gestört sein muß; wie, läßt sich noch nicht übersehen. Die Umkehr der Galvanotaxis bei vergifteten Fischen könnte auch als Symptom für eine Störung der funktionellen Polarität angesehen werden.

Die intermittierenden krampfartigen Bewegungen des vergifteten dekapitierten Frosches lassen den Schluß zu, daß im Gebiet der spinalen Motorik ein dauerndes An- und Abschwellen der Erregbarkeit stattfindet, das einmal eine normale koordinierte Übertragung der von oben oder von der afferenten Seite (bei spinalen Reflexabläufen) kommenden Impulse nicht gestattet und das zum anderen an eine selbständige spontane Entstehung von Erregungen in den motorischen Wurzelzellen oder an den Synapsen zwischen motorischen Wurzelzellen und Schaltneuronen denken läßt. Man kommt bei solchen Betrachtungen auf die Subordinationstheorie von LAPICQUE (1935, 1939) zurück; der Gedanke drängt sich auf, daß es an der Synapse zwischen motorischer Wurzelzelle und Schaltneuronen zu dauernd sich ändernden „Umstimmungen" oder „Metachronosen" kommen könnte (vgl. SCHAEFER, Elektrophysiologie, 1940, 1942).

Von der Vorstellung der Subordination ausgehend haben GAUDIN (1936) und MONNIER und GAUDIN (1936) durch intraperitoneale Injektion der insektiziden Pyrethrine Vergiftungen bei Fröschen hervorgerufen und Veränderungen der Chronaxie der von den motorischen Wurzelzellen ausgehenden Nervenfasern beobachtet.

Zusammenfassung.

Es werden Versuche über die Wirkung des Dichlordiphenyltrichlormethylmethans (DDT) und des Difluordiphenyltrichlormethylmethans

(DFDT) auf das Zentralnervensystem der Frösche (Rana temporaria und Rana esculenta) und zweier Kleinfische aus der Karpfenfamilie (Carassius vulgaris und Leucaspius delineatus) angestellt. Die Tiere zeigen bei zunehmender Vergiftung Unruhe, intermittierende tonisch-klonische Krämpfe und werden schließlich gelähmt. Bei den Fischen beobachtet man überdies Störungen der Gleichgewichtsfunktionen. Die Wirkung der Giftstoffe auf das Zentralnervensystem wird durch Anwendung der Galvanonarkose, des galvanischen Krampfes und des Wechselstromkrampfes untersucht (Stromdosisverfahren).

Es ergibt sich: Durch Vergiftung mit den kontaktinsektiziden Stoffen DDT und DFDT wird die für die Galvanonarkose nötige Schwellenstromstärke gesenkt; bei der Erholung des Tieres von der Vergiftung steigen die Galvanonarkoseschwellen wieder an. Aus dem Verlauf der Schwelle könnte man schließen, daß nach dem anfänglichen schnellen Einsetzen der Vergiftung, die sich in Lähmung äußert, ein Gegenmechanismus in Gang kommt, der die abgesunkene Galvanonarkoseschwelle vorübergehend wieder hebt.

Bei Fröschen wirkt das DFDT weniger toxisch als das DDT, während bei den untersuchten Fischen beide Stoffe ungefähr gleich toxisch wirken, wobei die Vergiftung bei Gaben von DFDT schneller einzusetzen scheint. Die Giftwirkungen von DDT und DFDT addieren sich.

Einige der untersuchten Fische reagierten auf der Höhe der Vergiftung kathodisch galvanotaktisch, während die normalen Tiere eine anodische Galvanotaxis zeigen. Diese Umkehr der Galvanotaxis ist reversibel, mit der Erholung der Fische tritt wieder anodische Galvanotaxis ein.

Die Schwellen des galvanischen Krampfes und des Wechselstromkrampfes werden durch die Vergiftung mit DDT und DFDT nicht verändert; sie behalten bis zur vollständigen Lähmung, in der galvanischer Krampf und Wechselstromkrampf überhaupt nicht mehr auslösbar sind, ihre normalen Werte bei.

Die Befunde sprechen dafür, daß durch DDT und DFDT außer den extrapyramidal-motorischen Zentren im Mittelhirn die spinale Motorik gestört und schließlich gelähmt wird. Es ist möglich, daß die Gifte an den motorischen Wurzelzellen und an den Synapsen zwischen motorischen Wurzelzellen und Schaltneuronen angreifen.

Literatur.

Adler, P.: Pflügers Arch. **230**, 113 (1932). — Z. Biol. **99**, 17 (1938). — Bethe, A.: Anat. Anz. **12**, 31 (1896). — Bishopp, F. C.: Amer. J. publ. Health **36**, 593, (1946). — Cameron, G. R.: Brit. med. Bull. **3**, No 9/10 (1945). — Crozier, W. J.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **24**, 282 (1936). — J. gen. Physiol. (Am.) **10**, 395 (1927). — Domenjoz, R.: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 952. — Fries, E. F. B.: J. gen. Physiol. (Am.) **11**, 507 (1928). — Gaudin, O.: C. r. Soc. Biol.

121, 764 (1936). — Hoffmann, I., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — Köllensperger, F. K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 575 (1938). — Köllensperger, F. K., u. F. Scheminzky: Pflügers Arch. **241**, 38 (1939). — Läuger, P., H. Martin u. P. Müller: Helvet. chim. Acta **27**, 892 (1944). — Lapicque, M.: C. r. Acad. Sci. Paris **201**, 573 (1935). — Lapicque, M., et L.: C. r. Soc. Biol. **130**, 1054 (1939). — Monnier, A. M., et O. Gaudin: C. r. Soc. Biol. **122**, 644 (1936). — Rose, M.: C. r. Soc. Biol. **97**, 51 (1927). — Schaefer, H.: Elektrophysiologie. Wien: Franz Deuticke 1940, 1942. — Scheminzky, F.: Pflügers Arch. **202**, 200 (1924); **243**, 439 (1940). — Scheminzky, F. u. Fr., u. F. Bukatsch: Tab. biol. period. (l.; Nd.) **19**, 76 (1941). — Scheminzky, F., M. G. Fuortes u. F. K. Köllensperger: Pflügers Arch. **242**, 126 (1939). — Scheminzky, F., O. Hochstädt u. P. Adler: Pflügers Arch. **237**, 284 (1936). — Scheminzky, F., u. F. K. Köllensperger: Pflügers Arch. **241**, 54 (1939). — Tonner, F.: Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **53**, 101 (1933). — Velbinger, H. H.: Dtsch. Gesdh.wes. **2**, 355 (1947). — Pharmazie **2**, 268 (1947).

Prof. Dr. med. Friedrich Schwarz,
(15b) Gera, Talstr. 40.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 625—654 (1949).

Beiträge zur Toxikologie einiger Schädlingsbekämpfungsmittel aus der Gruppe aromatischer Nitroverbindungen*.

Von

Hans Seel.

(Eingegangen am 4. August 1948.)

I.

Während die Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel nach der entomologischen Seite hin verhältnismäßig gut durchuntersucht sind, haben sie in toxikologischer Hinsicht bisher noch wenig Beachtung gefunden, falls es sich nicht gerade um spezielle Gifte gehandelt hat, die, wie die Arsen-, Quecksilber-, Blei- oder Zyanverbindungen usw., aus anderen Gründen toxikologisches Interesse beansprucht haben (siehe hierzu auch F. Flury und H. Zangger[1], H. Taeger[2], M. Bauer und H. Engel[3], R. Müller[4] u. a.). Ebenso sind auch die meisten Arbeiten auf dem Gebiete der angewandten Entomologie im toxikologischen Schrifttum bisher kaum berücksichtigt worden. Dies ist um so bedauerlicher, als die in großer Zahl vorliegenden, entomologisch-toxikologischen Untersuchungen und Erfahrungen ein interessantes Vergleichsmaterial für die toxikologische Auswertung an höher organisierten Poikilothermen und Homoiothermen und damit wertvolle Unterlagen für eine *vergleichende experimentelle Toxikologie* liefern; zudem können die Methoden der angewandten Entomologie auch der toxikologischen Forschung und Methodik manche Anregung bieten. Die Möglichkeit, toxikologische Versuche an Insekten durchzuführen, ist aber in unserer Zeit auch noch deswegen besonders wertvoll, weil diese größere Reihenversuche mit statistischer Sicherung der Ergebnisse und verhältnismäßig einfache pharmakologische und pathologisch-anatomische Studien an einem billigen und leicht zu beschaffenden Tiermaterial gestatten.

Die Sammlung und Zucht vieler Insekten ist, bei einiger Erfahrung, ziemlich einfach. Ohne größere Schwierigkeiten gelingen z. B. nach meinen Erfahrungen Zuchten von *Anopheliden* und *Culiciden* (Stechmücken), deren Larven in ihren verschiedenen Stadien ausgezeichnete und leicht zu beobachtende Versuchsobjekte darstellen, ferner die heimischen *Tabaniden* (Bremsen), die zahlreichen Arten der *Musciden* (Fliegen), besonders die Gattungen *Musca domestica* L. (Stubenfliege), die *Calliphorinen* (Fleischfliegen) und *Sarcophaginen* (Schmeißfliegen) bzw. deren Larven u. a. m. Sehr leicht zu halten und zu züchten sind auch die *Blatteria* (Schaben), von denen die (größere) *Blatta orientalis* L. (orientalische Schabe) und die (kleinere) *Blatta germanica* L. (deutsche Schabe, Küchenschabe) weit verbreitet sind. Schwieriger zu beschaffen ist dagegen die ziemlich

* Die Untersuchungen entstanden während meiner Tätigkeit als Toxikologe des Flieger-Forstschutzverbandes in den Jahren 1939—1943. Aus zeitbedingten Gründen gelangen sie erst jetzt zur Veröffentlichung.

große *Periplaneta americana* L. (amerikanische Schabe). Die Blattaria sind besonders empfindlich gegen Kontaktgifte. Sehr giftresistent dagegen, doch ebenfalls ohne Schwierigkeit zu züchten, ist *Calandra granaria* L. (Kornkäfer). Giftempfindlicher wiederum sind Larven und Imagines von *Tenebrio molitor* L. (Mehlkäfer), deren Larven sich gleichfalls gut zu toxikologischen Untersuchungen eignen. Leicht zu sammeln und zu halten, in ihrem Auftreten jedoch saisonmäßig gebunden, sind auch die Imagines von *Meligethes aeneus* L. (Rapsglanzkäfer), *Agriotes lineatus* L. (Saatschnellkäfer), deren Larven („Drahtwürmer"-Elateriden) als Wurzelschädlinge äußerst verheerend wirken, ferner *Melolontha hippocastani L.* (Waldmaikäfer) und *Melolontha melolontha* L. (Feldmaikäfer), *Leptinotarsa decemlineata* L. (Kartoffel- oder Koloradokäfer *) u. a. m., sowie zahlreiche Lepidopteren bzw. die Raupen von *Agrotis segetum* L. (Saateule), *Lymantria monacha* L. (Nonne), *Bupalus piniaria* L. (Kieferspanner), *Noctua griseovariegata* Goetze (Forleule), *Lymantria dispar* L. (Schwammspinner), *Orgyia antiqua* L. (Schlehenspinner) u. a. m. (s. auch H. WEYER und H. ZUMPT[5], E. MARTINI[6], F. ZUMPT[7], H. EIDMANN[8], F. SCHWERDTFEGER[9], H. PAPE[10], NÜSSLIN-RHUMBLER[11], H. ESCHERICH[12], J. W. HARMS[13], W. KÜKENTHAL[14], A. KÜHN[15], C. SCHLIEPER[16] und andere).

Die Verwendung von Insekten zur toxikologischen Analyse ist aber auch deswegen praktisch vorteilhaft, weil neuerdings verschiedene Schädlingsbekämpfungsmittel in der Human- und Veterinärmedizin, hier wiederum vorwiegend in der praktischen Hygiene und Dermatologie, bei der Bekämpfung von Ekto- und Endoparasiten erhebliche Bedeutung gewonnen haben. Es sei in diesem Zusammenhang nur erinnert an die Anwendung von *Dichlordiphenyltrichlormethylmethan* (DDT, Gesarol, Gesapon, Duolit usw.) zur Bekämpfung von Fliegen (als Überträger von Infektionskrankheiten), Milben, Läusen und Wanzen u. a. (siehe hier auch LÄUGER, H. MARTIN und P. MÜLLER[17], R. RIEMENSCHNEIDER[18], W. SCHÖNFELD[19], H. W. VELBINGER[20] u. a.**) oder an die Einführung der *Pyrethrine* (aus *Pyrethrum cinerariaefolium* L.) in die Therapie der Oxyuriasis (Campiol). In solchen Fällen sind Insekten die gegebenen Versuchstiere, da ja die Ergebnisse entomologisch-toxikologischer Analysen zunächst überhaupt über die Verwendungsmöglichkeit solcher Insektizide entscheiden. Vielseitige und genaue Vergleichs- und Reihenuntersuchungen können vor manchen Fehlschlägen und Überraschungen bewahren, wie z. B. die nur sehr bedingte Wirksamkeit des Dichlordiphenyltrichlormethylmethans gegen Cimiciden, besonders *Cimex lectularius* L. (Bettwanze), gezeigt hat. Selbstverständlich ist aber auch eine entsprechende, eingehende pharmakologische Prüfung derartiger Mittel an Warmblütern erforderlich, vor allem, wenn diese für die Anwendung in Wohnräumen, Ställen usw. oder gar unmittelbar an Tier und Mensch in Betracht kommen. Hier kann die Zusammenarbeit zwischen angewandter Entomologie und Toxikologie bzw. Pharmakologie ungemein befruchtend wirken.

Verdienen also einerseits die entomologisch-toxikologischen Arbeiten und Methoden aus obigen Gründen allgemeinere und größere Beachtung auch von seiten der Pharmakologie und der Toxikologie, so ist andererseits die *Mitarbeit des Toxikologen* bei der experimentellen und praktischen Beurteilung und Anwendung von Schädlingsbekämpfungsmitteln dringend zu empfehlen. Diese ist vor allem deswegen notwendig, weil sich, wie die Praxis gezeigt hat, viele Entomologen über die absolute und relative Giftigkeit derartiger Schädlingsbekämpfungsmittel

* Hier sind jedoch die Vorschriften zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers im RGBl. I, 15. 4. 31 (S. 530) und 23. 2. 38 (S. 278 und 280) zu beachten!

** Dichlordiphenyltrichlormethylmethan und verwandte Verbindungen sind erstmals von A. v. BAEYER[21] und O. ZEIDLER[22] 1872 dargestellt worden.

offenbar keine rechte Vorstellung machen können und, verständlicherweise, auch über die Wirkungsweise solcher Insektizide am Warmblüter meist nur ungenügend unterrichtet sind. So findet man z. B. im entomologischen Schrifttum vielfach Bezeichnungen wie „unschädlich", „ungiftig" usw. für Schädlingsbekämpfungsmittel, die Nikotin, Veratrin oder andere starke Gifte enthalten (siehe hier auch K. Dauberschmidt[23], H. Itzerott[24], F. Zumpt[25]; ferner H. Seel[26]). Solange es sich dabei nur um die Verwendung von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln auf begrenzten Freilandflächen (Gärten usw.) oder in geschlossenen Räumen (z. B. Blausäure gegen Kornkäfer in Getreidesilos) handelt, ist die Gefahr toxischer Nebenwirkungen auf Menschen und Tiere nicht allzugroß, selbst wenn sehr giftige Mittel dieser Art, wie Arsen- oder Blausäureverbindungen *(Cyanamid)* angewandt werden, da diese ja in toxikologischer Hinsicht gut durchuntersucht sind; außerdem sind hierfür auch entsprechende Vorsorge- und Schutzmaßnahmen gesetzlich vorgeschrieben.

Ganz anders liegen die Verhältnisse aber, wenn *ausgedehnte Freilandflächen* (Wälder, Felder, große Monokulturen, Sumpfgebiete; z. B. bei der Malariaprophylaxe) für die Schädlingsbekämpfung in Betracht kommen. In solchen Fällen werden, zumal bei den *aviochemischen Bekämpfungsmethoden* (Einsatz von Flugzeugen), sehr große Mengen von Schädlingsbekämpfungsmitteln benötigt, die wegen der besonderen meteorologischen Verhältnisse (Wind, Sonnenschein, Regen), auch bei völliger Ausnutzung aller hygienischen Vorsorgemaßnahmen (Absperrung, Schutzanzüge, Schutzmasken, Nahrungsmittelkontrolle) immer noch eine große Gefahr für Mensch und Tier bedeuten. Bei der außerordentlich großen Zunahme der Schädlinge in allen Erdteilen, die, zum Teil wenigstens, auf unzweckmäßigen land- und forstwirtschaftlichen Maßnahmen (extreme Boden- und Waldnutzung, Anlage von Monokulturen, Mißachtung biologischer Grundsätze) und einer dadurch hervorgerufenen erheblichen Störung des *biozönotischen Gleichgewichtes* beruhen (siehe hierzu auch K. Friederichs[27], K. Escherich[28], ferner H. Seel[29]), hat man seit etwa 2 Jahrzehnten begonnen, auch entsprechend konstruierte Flugzeuge zur Schädlingsbekämpfung in Amerika, besonders in USA., in Sowjetrußland*, aber auch im mitteleuropäischen Wirtschaftsraum einzusetzen. Diese „*aviochemische Schädlingsbekämpfungsmethode*" hat seit 1925 in Deutschland, seit 1937 mit organisierten Verbänden, Eingang gefunden und in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen**. Während des Krieges sind nun auf Anregung von P. Mühlens und von H. Seel diese aviochemischen Methoden auch zur Anophelesbekämpfung in den Sumpfgebieten des Ostens sowie auf dem Balkan herangezogen worden. Für diese Zwecke stand damals ein seit 1937 aufgestellter Spezial-Flugzeugverband („Flieger-Forstschutzverband") mit zuletzt 30—40 umgebauten Flugzeugen verschiedener Typen zur Verfügung, dessen zunehmende Tätigkeit aus nachstehender Tabelle 1 (nach Dauberschmidt) erkenntlich ist.

Bei den einzelnen Flügen werden nun, je nach Größe der Flugzeugtypen, jeweils 1000—2000 kg und mehr gifthaltige Schädlingsbekämpfungsmittel ausgeworfen, wobei die Streudichte von der Art des Schädlings, des verwendeten Giftes und dem Charakter der zu behandelnden Fläche abhängig ist. Diese kann

* In Nord- wie in Südamerika mit den dort üblichen ausgedehnten Monokulturen (Baumwolle, Weizen usw.) wie auch in der Sowjet-Union ist das Land weithin zu einer „Kultursteppe" geworden. Wegen der dadurch hervorgerufenen Verarmung des *Biozöns* kann heute Nordamerika als das Land der größten Schädlingsplagen angesehen werden (K. Friederichs[27]). Ähnliches ist auch ohne Übertreibung von Sowjetrußland zu sagen.

** Das erste Patent auf die Flugzeugschädlingsbekämpfung wurde in Deutschland 1912 bereits von Forstmeister Zimmermann erworben.

Tabelle 1. *Übersicht über die Entwicklung der aviochemischen Schädlingsbekämpfung in den Jahren 1937—1942.*

Jahr	Fläche in ha	Giftmenge in Tonnen	Zahl der Flugzeuge	Methode	Art der Schädlinge
1937	5000	400	3	Stäubemethode	Forstschädlinge
1938	9000	500	8	Stäubemethode	Forstschädlinge
1939	15000	700	10	Stäubemethode	Forstschädlinge
1940	13000	800	10	Stäubemethode	Forst- und Landwirtschaftsschädlinge
1941	15500	1000	14	Stäubemethode	Forst- und Landwirtschaftsschädlinge
	500	100	3	Sprühmethode	
1942	10400	380		Stäubemethode	
	150	27		Sprühmethode	
	7000	6	20	Nebelmethode	Med. Schädlinge (Anopheleslarven)
außerdem	1870	36	4	Stäube- und Sprühmethode	Med. Schädlinge (Anopheleslarven)
1943	24800	760	13	Stäubemethode	Forst-, Landwirtschafts- und med. Schädlinge
	100	12	4	Nebelmethode	Forst-, Landwirtschafts- und med. Schädlinge
	9000	12,5	1	Sprühmethode	Forst-, Landwirtschafts- und med. Schädlinge
davon:					
Forstwirschaft	9335	486,85			
Landwirtschaft	9545	57,65			
Malaria	15000	240.0			
insgesamt:	109950 ha	1937—1943	(7 Jahre)		
gegenüber:	37000 ha	1925—1934	(10 Jahre)		

zwischen 5 und 250 kg je Hektar schwanken. Demnach kommen also mitunter recht erhebliche Giftmengen zum Einsatz, die in dichten Wolken verstäubt, versprüht oder unter Benutzung von Nebelstoffen (als Schutznebel oder als Trägernebel mit insektiziden Wirkstoffzusätzen) vernebelt werden. Dadurch werden zwangsläufig Fauna und Flora mehr oder weniger stark in Mitleidenschaft gezogen. Es ist deshalb auch nicht erstaunlich, daß seit der Verwendung von Flugzeugen zur Schädlingsbekämpfung immer wieder erhebliche Giftschäden bei Pflanzen und Tieren aufgetreten sind. Bereits 1927 hat z. B. H. KRIEG[30] auf eine, durch Arsenbestäubung vom Flugzeug aus eingetretene Massenvergiftung von Tieren hingewiesen. Seit dieser Zeit sind immer wieder Giftschäden, vor allem bei der aviochemischen Forstschädlingsbekämpfung, gemeldet worden (Literatur siehe bei W. TRAPPMANN[31]). Aus diesem Grunde hatte sich bereits 1932 K. ESCHERICH[3] zu der Forderung veranlaßt gesehen, daß im Forstschutz keine arsenhaltigen Fraßgifte mehr verwendet werden sollen. An deren Stelle sind dann zunächst Kontaktgifte vom Typ der aromatischen Nitroverbindungen verstäubt worden. Diese haben sich zunächst auch, vom forstlichen Standpunkt der Schädlingsbekämpfung aus gesehen, wegen ihrer ausgezeichneten insektiziden Eigenschaften sehr gut bewährt; die Erfahrungen der letzten Jahre zeigten jedoch, daß der Wechsel der Schädlingsbekämpfungsmittel hinsichtlich der toxischen Nebenwirkungen auf Menschen und Tiere keinen wesentlichen Vorteil bedeutete.

Diese und andere Gründe* sind bestimmend dafür gewesen, nach neuen, arsenfreien oder anderen, unschädlicheren Austauschmitteln für die forstliche,

* Auf die Vor- und Nachteile der chemischen bzw. aviochemischen Schädlingsbekämpfungsmethoden und ihre Beurteilung gegenüber anderen biologischen Methoden, besonders unter Berücksichtigung des Biozöns bzw. des Holozöns, ist an anderer Stelle eingegangen worden (vgl. H. SEEL[29]).

landwirtschaftliche und medizinische Schädlingsbekämpfung zu suchen, vor allem unter Berücksichtigung ihrer Eignung bei Verwendung größerer Giftmengen, wie dies eben bei der Bestäubung mittels Flugzeugen unvermeidlich ist. Diese Mittel müssen sich durch eine rasche und zuverlässige insektizide bzw. larvizide Wirkung und durch möglichst geringe toxische Nebenwirkungen auf Pflanzen, Tiere und Menschen auszeichnen. Einen wesentlichen Fortschritt in dieser Hinsicht hat die Einführung des Dichlordiphenyltrichlormethylmethans (Gesarol) bedeutet, doch sind bei Verwendung größerer Mengen desselben auch hier noch nicht die Gefahren toxischer Nebenwirkungen ausgeschaltet (siehe auch H. Seel[29]).

Wenn auch die aviochemischen Schädlingsbekämpfungsmethoden gegenwärtig, wenigstens für den mitteleuropäischen Raum, keine große Rolle mehr spielen, so ist doch in nächster Zukunft wieder in größerem Umfange mit ihrer Anwendung auch in Europa zu rechnen, um so mehr, als infolge der Nachkriegsverhältnisse die Schädlinge in der Land- und Forstwirtschaft wieder außerordentlich zugenommen haben. Man wird daher nicht umhin können, diese Methoden in Kürze wieder anzuwenden, zumal die biologischen Schädlingsbekämpfungsmethoden erst auf lange Sicht hin wirksam werden können. In der Ostzone ist dies bereits 1948 wieder der Fall gewesen.

Bei der chemischen bzw. aviochemischen Schädlingsbekämpfung in der Forstwirtschaft finden nun außer den *arsenhaltigen* Fraßgiften neuerdings vor allem die Mittel aus der Reihe der *aromatischen Nitroverbindungen* sehr viel Verwendung. Während erstere jedoch in toxikologischer Hinsicht als verhältnismäßig gut durchuntersucht gelten können, trifft dies für die aromatischen Nitroverbindungen weniger zu. Lediglich die *akute* Vergiftung mit diesen Stoffen ist toxikologisch und klinisch eingehender bearbeitet worden; die subakute und die *chronische* Vergiftung, besonders bei *wiederholter Einwirkung kleinster Mengen* solcher Stoffe, hat bisher jedoch kaum Beachtung gefunden.

Gerade diese Form von Vergiftung mit relativ *kleinen* Mengen von Schädlingsbekämpfungsmitteln gewinnt aber bei der Flugzeugbestäubung große praktische Bedeutung, um so mehr, als die aromatischen Nitroverbindungen, wie das Dinitro-o-kresol und einige Dinitrophenole während des Krieges auf meinen Vorschlag hin auch zur Anophelesbekämpfung in den Sumpfgebieten verwendet worden sind. Ihre Anwendung ist aber nur in landwirtschaftlich ungenutzten Sumpfgebieten möglich. Die von Zumpt an die Kontaktwirkung der Dinitroverbindungen auf Mücken zur Bekämpfung der Culicidenplage geknüpfte Hoffnung ist deswegen kaum zu erfüllen, weil gerade Laubpflanzen, im Gegensatz zu Nadelhölzern, äußerst empfindlich auf die nitrierten Phenole und Kresole reagieren und „verbrennen". Aus diesem Grund ist ihre Anwendung in Gegenden mit landwirtschaftlichen Kulturen nicht möglich. Hier könnten dagegen Thiodiphenylamin und andere Gifte, besonders aus der Pyridinreihe, letztere auch bei Verwendung künstlicher Nebel als Trägerstoffe der Insektizide zur Mückenbekämpfung in Betracht kommen, zumal diese nicht nur ausgezeichnete Lösungsmittel darstellen, sondern selbst auch gute insektizide und larvizide Eigenschaften besitzen (H. Seel[33]).

Verschiedene Verbindungen aus der aromatischen Nitroreihe sind nun in den letzten Jahren von E. Gross, M. Bock und F. Hellrung[34] sowie von Heubner und Mitarbeitern[35], vor allem hinsichtlich ihrer Einwirkung auf das *Hämoglobin* bzw. die *Methämoglobinbildung* (*Hämiglobin*)

sowie die Entstehung sog. HEINZscher Innenkörperchen eingehender untersucht worden.

Aus der Gruppe der aromatischen Nitroverbindungen dienen zur Schädlingsbekämpfung vor allem das *Dinitro-o-kresol* sowie α-, β- und γ-*Dinitrophenol,* in geringerem Umfange auch o-, m- und p-*Nitrophenol.* Diese nitrierten Phenole sowie das Dinitro-o-kresol zeigen schon hinsichtlich ihrer insektiziden bzw. larviziden Eigenschaften gewisse Unterschiede.

Nach F. TATTERSFIELD[36] erweisen sich Phenol und die 3 Kresole an *Aphis rumicis* und an Eiern von *Selenia tetralunaria* als etwa gleich wirksam. Methylierung der phenolischen Hydroxylgruppen setzt die Wirksamkeit herab, Einführung weiterer Hydroxylgruppen vermindert die insektizide Wirkung der Phenole, eine solche von 1 oder 2 Nitrogruppen dagegen steigert ihre insektiziden Eigenschaften, während die Einführung der dritten Nitrogruppe wiederum ihre Wirksamkeit herabsetzt. Nach K. MÖBIUS und E. WEDEKIND[37] ist das 2,4-Dinitrophenol als Kontaktgift bei Raupen des Kiefernspinners *(Dendrolimus pini)* und der Forleule *(Noctua griseovariegata* Goetze) giftiger als o-Nitrophenol und dieses wiederum wirksamer als p-Nitrophenol. Andererseits erweist sich das Dinitrophenol als toxischer wie das Trinitrophenol. Ähnliche Unterschiede bezüglich der insektiziden bzw. larviziden Wirkung nitrierter Phenole (o- und p-Nitrophenol, Dichlornitrobenzol, Dinitro-o-kresol usw.) haben auch wir bei verschiedenen Schädlingen festgestellt. Während z. B. das Dichlornitrobenzol alle Larven von Mehlkäfern *(Tenebrio molitor)* in einer Konzentration von 1:600 innerhalb von 132 Std. tötet, ist das Chlordinitrobenzol innerhalb 156 Std. bei derselben Konzentration noch völlig wirkungslos. Auch bei Kornkäfern *(Calandra granaria)* erhält man ähnliche Ergebnisse. So führt Dichlornitrobenzol z. B. in der Konzentration von 1:600 innerhalb 96 Std. zu einer restlosen Abtötung aller Kornkäfer, während das Chlordinitrobenzol in derselben Konzentration innerhalb 168 Std. völlig unwirksam ist. *Dinitro-o-kresol* ist dagegen bei der gleichen Konzentration bereits innerhalb 49 bzw. 30 Std. wirksam. Ähnliche Unterschiede konnten auch an Larven von *Anopheles maculipennis* sowie an den Raupen des Pfauenauges *(Vanessa io)* beobachtet werden. α- und β-Dinitrophenol führten hier z. B. in einer Konzentration von 1:1000 innerhalb von 22 Std. eine restlose Abtötung der Anopheleslarven herbei; γ-Dinitrophenol dagegen ergab innerhalb 24 Std. nur eine Wirkung von 40%. p-Nitrophenol wiederum tötet Anopheleslarven unter denselben Versuchsbedingungen innerhalb *einer* Stunde zu 100% ab, während o-Nitrophenol zu demselben Effekt 22 Std. benötigt. Es bestehen somit deutliche Wirkungsunterschiede in Abhängigkeit von der chemischen Konstitution dieser Gifte, offenbar aber auch von der Tierart, denn nach OSWALD[38] sind bei Warmblütern p-Nitrophenol und m-Nitrophenol doppelt so giftig wie die o-Verbindung.

Ähnliches Verhalten zeigen auch die *Dinitrophenole* bei Anopheleslarven. Diese sind, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von TATTERSFIELD sowie von MÖBIUS und WEDEKIND, bei Insekten toxischer als die *Mononitro*verbindungen, während dagegen das *Trinitrophenol* bzw. die Pikrinsäure wieder weniger giftig als die *Dinitrophenole,* aber giftiger als die *Mononitro*verbindungen ist. Hinsichtlich des Charakters der Giftwirkung ist von Interesse, daß die Dinitrophenole anfangs mehr oder weniger starke Erregung (bis zum Auftreten tonisch-klonischer Krämpfe bzw. Tetanus), späterhin Lähmungserscheinungen verursachen, ähnlich, wie dies auch bei Warmblütern zu beobachten ist. Die *aromatischen Nitroverbindungen wirken bei Insekten vorwiegend durch direkte Berührung („Kontaktgifte").*

Zur Toxikologie der Dinitrophenole am *Warmblüter* geben Flury und Zernik[39] an, daß der allgemeine Charakter der Giftwirkung ähnlich denjenigen der übrigen aromatischen Nitroverbindungen sei, doch schwächer als Nitrobenzol. Die Dinitrophenole entfalten eine ausgesprochene Reizwirkung auf die Schleimhäute. Die letale Dosis an Katzen liegt bei 0,05 g je Kilogramm, an Kaninchen bei 0,08 g je Kilogramm (subkutan). Die Tiere gehen innerhalb weniger Minuten nach tonisch-klonischen Krämpfen infolge Lähmung des Atemzentrums zugrunde (W. Gibbs und E. Reichert[40]). — Beim Trinitrophenol beträgt die tödliche Dosis für Kaninchen etwa 0,2 g je Kilogramm subkutan und 0,15 g je Kilogramm intravenös. Vom Menschen sind jedoch schon 1,0 g, ja selbst bis zu 3,8 g Pikrinsäure vertragen worden. Vergiftungssymptome sind: Steigerung der Gewebsoxydationen mit Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs bis auf das Zwölffache, Zunahme der Atemfrequenz und der Temperatur, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Exanthembildung. Die Atemstörungen beherrschen das klinische Vergiftungsbild. Im Blut sind Milchsäure und Azetonkörper vermehrt; ferner kommt es zu Methämoglobinbildung, hypochromer Anämie, Agranulozytose, Thrombopenie und Purpura. Über die *chronische* und wiederholte Vergiftung mit *kleinen* Giftmengen, besonders beim Menschen, liegen jedoch bisher keine Untersuchungen vor.

Besser untersucht ist das *Dinitro-o-kresol,* da in den letzten Jahren mehrere Todesfälle beim Arbeiten mit Dinitro-o-kresol eingetreten sind. In der Literatur finden sich auch noch einige Fälle mit tödlichem Ausgang beschrieben, bei denen die Vergiftung mit Dinitro-o-kresol auf dessen Verwendung als *Safran*-Surrogat zur Färbung von Nahrungsmitteln und Gebrauchsgegenständen zurückzuführen gewesen ist. Nach Lewin[41] ist z. B. bei einer Frau, die in einer Apotheke anstatt echten Safrans ein dinitro-o-kresolhaltiges Surrogat erhalten hatte, unter Krämpfen und Kurzatmigkeit der Tod erfolgt. Auch als Abortivum hat Dinitro-o-kresol schon gedient, wobei ebenfalls tödliche Vergiftungen beobachtet worden sind. Schließlich sind Todesfälle, auch infolge Verwendung von Dinitro-o-kresol als Entfettungsmittel, besonders in Amerika, bekannt geworden (L. Schwarz[42]). Schwarz beschreibt ferner einen Sektionsbefund bei einem Arbeiter in einem Nonnenkontaktgiftbetrieb, bei dem sich hochgradige venöse Stauungserscheinungen mit Lungenemphysem, fettiger Degeneration der Leberzellen sowie eine erhebliche Leukozytose in den Organen gefunden haben (s. auch Koopmann[43], M. Nordmann und O. Weber[44]). Derartige Befunde betreffen jedoch *Endzustände* nach einer *akuten Vergiftung* mit relativ *großen* MengenDinitro-o-kresol. Es können aber auch schon sehr geringe Mengen bzw. niedrige Konzentrationen schädigend auf Herz und Kreislauf einwirken, wie die Versuche von Staub und Mezeg[45] an isolierten Froschherzen sowie am Herzlungenpräparat der Katze zeigen. Die niedrigste schädigende Konzentration für 1-, 2-, 4-Dinitrophenol liegt hierbei um 1:1 000 000, für Dinitro-o-kresol um 1:5 000 000. Diese Ergebnisse sind deswegen von Interesse, da sowohl die Dinitrophenole wie das Dinitro-o-kresol, besonders in den USA., ihrer stoffwechselsteigernden Wirkung wegen in einer Dosierung von 0,5—1,0 mg/kg als Entfettungsmittel dienen. Bei diesen Gaben sollen angeblich keine Kreislaufstörungen erfolgen (Dodds[46]). Demgegenüber betonen jedoch Staub und Mezeg, daß die bei den genannten therapeutischen Gaben von 3—5 mg/kg Dinitrophenol und 0,5—1,0 mg/kg Dinitro-o-kresol im Blute entstehenden Konzentrationen bereits im *herztoxischen* Bereich liegen. Jedenfalls kommt es am Herzlungenpräparat bei diesen Konzentrationen zu einer Abnahme der Hubhöhe und einer Verminderung des Minutenvolumens, die durch Auswaschen nicht mehr behoben werden kann. De Chatel und Motika[47] haben gleichfalls beim Menschen unter der Einwirkung von Dinitrophenol Herzschädigungen mit Sinusarrhythmie und Überleitungsstörungen beobachtet.

Arzneiliche wie gewerbliche Vergiftungen mit Dinitrophenolen und Dinitro-o-kresol sind weiterhin besonders in England, aber auch in Frankreich und in anderen Ländern, entweder bei Verwendung derselben als Entfettungsmittel oder aber bei ihrer fabrikmäßigen Herstellung, häufiger vorgekommen. Danach genügt die tägliche Einnahme von 0,12—0,5 g Dinitrophenol, 14 Tage lang, um Temperaturerhöhung sowie Steigerung der Puls- und Atemfrequenz zu erzeugen; schließlich erfolgt unter Zyanose und Koma der Tod. Leichtere Vergiftungen verursachen Blutdrucksenkung und Beschleunigung der Herztätigkeit (MASSERMANN und GOLDSCHMIDT[48]). Gewerbliche tödliche Vergiftungen sind im Ausland bereits seit 30—40 Jahren bekannt. So sind 1913 in England zahlreiche Vergiftungen in Dinitrophenolbetrieben beobachtet worden, in Frankreich bis 1916 in 7 Betrieben bereits 27 Todesfälle bekannt geworden, ja schon um 1900 ist 1 Todesfall in einem Dinitrophenolbetrieb mitgeteilt worden (K. B. LEHMANN und SCHMIDT-KEHL[49]). — Im Anschluß an diese Vergiftungen mit letalem Ausgang sind auch eine Reihe experimenteller Untersuchungen durchgeführt worden, allerdings in der Hauptsache über die Wirkung des Dinitrophenols bei toxischen bzw. letalen Gaben. Danach kommt es bei Verabreichung tödlicher Dosen von Dinitrophenol an Hunden, Katzen und Kaninchen zu allgemeiner Unruhe, Beschleunigung der Atmung, Fieber, Erbrechen sowie zu einer rasch nach dem Tode einsetzenden Muskelstarre (TSCHERKESS und Mitarbeiter[50]). Besonders auffallend ist der schnelle Eintritt der Todesstarre bei der Dinitrophenolvergiftung. Die tödliche Dosis bei peroraler Verabreichung wird mit etwa 0,05 g/kg angegeben (MAGNE, MAYER und PLANTEFOL[51]). Bei intravenöser Verabreichung ist die letale Dosis angeblich etwas geringer.

Aus den in der Literatur vorliegenden Angaben ergibt sich somit folgendes *akutes Vergiftungsbild:*

Allgemeine Schwäche, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Benommenheit, Schlaflosigkeit, Neigung zu Schweißausbrüchen, Subikterus, Durchfälle, Schmerzen in Magen- und Lebergegend, Pulsbeschleunigung, Blutdrucksenkung, Zunahme der Atemfrequenz, Temperaturanstieg, Abmagerung, später Bewußtseinstörungen, Zyanose, Dyspnoe, schließlich Stillstand der Herz- und Atemtätigkeit. Im Urin ist meist die Anwesenheit von Nitrokörpern nachzuweisen. Auffallend rasch erfolgt die Totenstarre. — Es besteht eine unterschiedliche individuelle Empfindlichkeit gegenüber den Giften. Alkoholiker sowie Menschen mit Herz-, Nieren- oder Leberleiden gelten als besonders gefährdet.

Bei der *chronischen* bzw. *subakut* verlaufenden Vergiftung infolge dauernder oder häufig wiederholter Aufnahme und Einwirkung kleiner Gifmengen werden neuerdings folgende Symptome angegeben[52]: In leichtesten Fällen Verminderung des Hämoglobingehaltes und der Erythrozytenzahl bei gleichzeitig bestehender Hautblässe mit leichtem Subikterus. Subjektiv bestehen leichte Ermüdbarkeit, Schwindelanfälle, Kopfschmerzen und Neigung zu Herzklopfen. Bei stärkerer und nachhaltigerer Gifteinwirkung bilden sich schwere hypochrome Anämien mit spärlichen, degenerativen und redegenerativen Veränderungen des Blutbildes aus, regelmäßig begleitet von einem ausgeprägten pleiochromen Ikterus, gegebenenfalls mit gleichzeitiger methämoglobiner Zyanose bis zu schmutzig graugelber, marmorierter Hautfärbung. Ferner machen sich auch periphere Nervenstörungen bemerkbar. Im weiteren Verlauf finden sich im Blutbild alle Zeichen eines gesteigerten hämolytischen Blutkörperchenzerfalls, Auftreten von HEINZschen Körperchen sowie Symptome einer beginnenden Leberinsuffizienz. Im Harn sind neben Urobilin und Urobilinogen auch Gallenfarbstoffe nachweisbar. Die chronische Vergiftung kann mitunter unter dem Bild der *akuten gelben Leberatrophie* rasch tödlich verlaufen.

II. Dinitro-o-kresol-Vergiftung beim Menschen.

a) Akute Vergiftung.

Im Sommer 1940, gelegentlich eines aviochemischen Schädlingsbekämpfungsunternehmens im Sudetengebiet, traten erstmals bei 30 zur Beladung von Bestäube-Flugzeugen eingesetzten Arbeitern akute Vergiftungen mit Dinitro-o-kresol-Staub auf. Wie es sich später herausstellte, war die Vergiftung dadurch entstanden, daß die gelieferten Gasmasken undicht und vorher nicht geprüft waren. Infolgedessen machten sich bereits 1—2 Stunden nach Beginn der Arbeit bei allen Arbeitern zunächst Reizerscheinungen von seiten der Augen, der Nase, des Rachens und der Bronchien, bei einigen auch Magenbeschwerden mit Erbrechen bemerkbar. Bei fast allen Arbeitern waren am nächsten Tage Konjunktivitis und Laryngitis, bei einigen außerdem eine sehr heftige Bronchitis aufgetreten.

Die am zweiten Vergiftungstag durchgeführten Untersuchungen des Blutbildes, des Serum-Cholesterinspiegels und des Rest-Stickstoffspiegels im Blute ergaben zunächst einen auffallend hohen *Hämoglobingehalt* zwischen 100 und 123%, obwohl die Zahl der Erythrozyten zwischen 4 und 4,5 Millionen lag. Der Färbeindex war also erheblich erhöht (gesteigerter Erythrozytenzerfall?). Die *Leukozyten* nahmen dagegen außerordentlich ab (bis auf 1200); in einigen Fällen bestand aber auch eine erhebliche Leukozytose (11000—12000). Auffallend waren gleichzeitig eine Vermehrung der *eosinophilen Zellen* und vereinzelt das Auftreten von *Jugendformen* (bis zu 70%). Die Zahl der Lymphozyten war relativ vermindert, die der *Monozyten* dagegen erhöht (bis 11%).

Der *Serumcholesterin*spiegel zeigte verhältnismäßig niedrige Werte. Umgekehrt verhielten sich die *Rest-N-Werte*, die außerordentlich erhöht waren (bis zu 146 mg-%), ohne daß, auch bei längerer Lazarettbeobachtung, irgendwelche Nierenschädigungen nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise war diese Erhöhung der Rest-N-Werte auf einen vermehrten Eiweißabbau unter dem Einfluß des Dinitro-o-kresols zurückzuführen. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit zeigte in allen Fällen normale Werte. Temperaturerhöhungen lagen nicht vor. Wa.R. und Nebenreaktionen waren in allen Fällen negativ.

Die Urinuntersuchungen ergaben einmal eine positive Aldehydreaktion. *Urobilinogen* war fast immer in Spuren nachweisbar. Im übrigen waren weder chemisch noch mikroskopisch pathologische Abweichungen festzustellen.

b) Subakute bzw. chronische Vergiftung.

Einen ganz anderen Ablauf des Vergiftungsbildes ließen dagegen die *subakuten* bzw. *chronischen* Vergiftungen mit Dinitro-o-kresol (oder

Dinitrophenol) erkennen. Solche Vergiftungserscheinungen kamen im Laufe der Jahre mehrfach vor, insbesondere beim fliegenden und Bodenpersonal, soweit dieses wiederholt zu Schädlingsbekämpfungsaktionen eingesetzt worden war. Die subjektiven Beschwerden waren anfangs meistens sehr gering; die Untersuchung ließ außer einer mäßigen Gelbfärbung der Haut und der Haare auch objektiv keine besonderen Symptome erkennen. In Ermangelung derartiger manifester Vergiftungssymptome wurden daher zur Sicherung der Frühdiagnose fortlaufend Vollblutkontrollen, Bestimmungen der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, des Cholesterinspiegels und des Rest-N-Spiegels im Blut vorgenommen; ebenso regelmäßig Urinkontrollen und, gegebenenfalls auch, Untersuchungen des Magensaftes, des Stuhls usw.; desgleichen wurde das Blut auf Anwesenheit von Heinzschen Innenkörperchen und Hämoglobinbildung kontrolliert.

Aus der Tabelle 2, in der die wichtigsten Untersuchungsergebnisse jeweils vor und nach einem Einsatz zusammengestellt sind, ergibt sich, daß im Laufe der Jahre *Hämoglobin*gehalt und parallel damit auch die Zahl der *roten Blutkörperchen* abgenommen haben. Ebenso läßt die *Leukozytenzahl* eine deutliche Tendenz zur Abnahme bis zu einer ausgesprochenen Leukopenie erkennen. Der *Rest-N*-Gehalt ist einmal, kurz nach einem größeren Einsatz, auffallend erhöht (116,4 mg-%), im übrigen jedoch erniedrigt gewesen. Die Cholesterinwerte, die anfangs über der Norm lagen, sanken im Laufe der Zeit deutlich ab. Parallel damit ging auch eine Gewichtsabnahme von 75 kg (1939) auf 71 kg (1941) und auf 66 kg (1943), obwohl die Ernährung in diesem Falle (Flugzeugführer) während der ganzen Zeit gleich geblieben war. Heinzsche Innenkörperchen waren in keinem Falle nachweisbar; desgleichen verliefen die mehrfach durchgeführten Untersuchungen auf Hämiglobin negativ. Im Urin war gelegentlich Urobilinogen nachweisbar. Im übrigen zeigten die Organe, abgesehen von der verschiedentlich gelb gefärbten Zunge, insbesondere Lunge, Herz und Leber, auch röntgenologisch keine pathologischen Veränderungen. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit war anfangs mehrfach verlangsamt, lag aber sonst im Bereich des Normalen. Ähnliche Feststellungen konnten bei allen Mitgliedern des Verbandes erhoben werden, soweit sie in enger Berührung mit den Bestäubeflugzeugen kamen (Flugzeugführer, Bordmechaniker, Ingenieure usw.).

Diese übereinstimmenden Ergebnisse lassen erkennen, daß bei *wiederholter* Einwirkung *kleiner* Giftmengen sich allmählich hypochrome Anämien mit gleichzeitiger Abnahme der Leukozyten (Leukopenie), aber mit relativer Lymphozytose und Monozytose ausbilden. Parallel damit gehen die Veränderungen der Rest-N-Werte (mit einer Ausnahme) und des Cholesterinspiegels sowie die, trotz aller therapeutischen Maßnahmen und sehr guter Ernährung, eingetretenen Gewichtsverluste.

Vergleicht man nun die Erscheinungen nach *akuter* und nach *chronischer* Gifteinwirkung, so findet man also bei *akuten* Vergiftungen eine starke *Erhöhung* der *Rest-N-Werte*, bei *chronischen* Vergiftungen dagegen eine *Senkung* derselben. Die gelegentlich beobachteten, erhöhten Rest-N-Werte während der Streuflüge sind daher wohl auf eine vorübergehende Einwirkung *größerer* Giftmengen, also auf *akute* Giftwirkungen zurückzuführen. Der *Cholesterin*spiegel zeigt dagegen bei der *chronischen* Vergiftung erst im Laufe der Jahre eine geringe Neigung zur Erniedrigung, während er bei der *akuten* Vergiftung zum Teil rasch und erheblich absinkt. Diese relativ mäßige Senkung des Serum-Cholesterins während der Streueinsätze ist wohl in der Hauptsache darauf zurückzuführen, daß zu allen Zeiten, insbesondere während der Einsätze, eine sehr fett- und lipoidreiche Verpflegung (Milch!) gewährt worden ist.

Die *Resorption* des Giftes geht in der Hauptsache wohl durch die *Körperhaut* selbst vor sich, vor allem durch die Haut des

Tabelle 2. *Verlauf der subakuten Vergiftung mit Dinitro-o-kresol bei einem Flugzeugführer.*

Tag der Untersuchung	Hämoglobin	Erythrozyten	Leukozyten	Senkung	Rest-N im Blut mg-%	Cholesterin im Sediment mg-%	Bemerkungen
13. 10. 39	110	5334000	11400	4/6	21,0	225	Röntgenuntersuchung, Cor und Pulmo o. B. Urin o. B.
23. 11. 39	110	5104000	6600	1/2	—	—	Alter 28 Jahre, Gewicht **75** kg netto
28. 5. 40	85	4700000	12000	1/3	**116,4**	250	
12. 9. 40	78	3900000	3800	10/14	17,0	180	Augenreiz bei Arbeiten. Urin: Urobilinogen +
22. 4. 41	90	4350000	4200	—	—	—	
26. 8. 41	82	4160000	3200	2/4	—	—	Blut: Neigung zu Hämolyse; Gewicht **71** kg netto
2. 9. 41	—	—	3400	7/10	19,0	200	Urin: Urobilinogen +, Diazo ⊖
23. 9. 41	85	4010000	3200	—	—	—	Gesichtshaut gelblich verfärbt
19. 2. 42	89	4140000	5200	6/12	27,5	160	Zunge *gelblich* belegt.
25. 7. 42	100	5280000	7000	5/10	47,0	162	Urin: o. B. Vor Einsatz; Gewicht 71 kg netto.

1942: Röntgenuntersuchung Cor und Pulmo o. B. Urin o. B. Einsatz zur Malariabekämpfung. Nach Einsatz Gewicht 69,0 kg netto. Arbeiten mit Arsen in Saloniki.

1943: Konjunktivitis, Ekzem der Hände, Leberthérapie, Ferro-Arsen, Urin o. B. Gewicht **67,0** kg. Thrombozyten 260000. Urin o. B. Retikulozyten 63360. Röntgenuntersuchung Cor und Pulmo o. B.

Gesichtes und der Hände, da diese immer stark gelb gefärbt sind. Eine Aufnahme des Giftes durch Verschlucken oder Einatmen desselben ist bei den getroffenen Vorsorgemaßnahmen mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, zumal regelmäßig vor dem Einsatz (mit Ausnahme des unter a) genannten Sonderfalles) eine eingehende Prüfung der Schutzmasken und der Schutzkleidung durchgeführt worden ist. Es bleibt somit nur die *Resorption durch die Körperhaut* übrig.

Zur Klärung der Frage nach möglichen *Leberschädigungen* durch wiederholte Dinitro-o-kresol-Einwirkungen wurden späterhin bei allen Mannschaften des Verbandes, vor allem bei denjenigen, die vorübergehend Urobilinogen im Urin ausgeschieden haben, mehrmals Blutuntersuchungen nach TAKATA und im Vergleich hierzu die vereinfachte Reaktion nach E. GROSS[53] durchgeführt. Diese Reaktionen verliefen jedoch in allen Fällen negativ.

Bei der *akuten* und der *chronischen* bzw. *subakuten* Einwirkung der Dinitrophenole bzw. des *Dinitro-o-kresols* verlaufen also die Veränderungen im roten wie im weißen Blutbild *zunächst* ziemlich gleichartig. Die *Hämoglobinwerte* sind anfangs überhöht, die *Erythrozytenzahlen* dagegen relativ vermindert, so daß der Färbeindex über 1 ansteigt. Im weiteren Verlaufe nehmen jedoch die Hämoglobin- wie Erythrozytenwerte im Sinne einer hypochromen Anämie ab, wobei das Ausmaß derselben deutlich von der Dauer und der Intensität der Gifteinwirkung abhängig ist. In einigen Fällen haben sich, unter Ausschluß anderer Ursachen, Werte bis zu 60% Hämoglobin und 2,8 Millionen Erythrozyten ergeben.

Das *weiße Blutbild* läßt zunächst ebenfalls einen gleichartigen Verlauf der Veränderungen bei der *akuten* wie bei der *subakuten* Vergiftung erkennen. Hier kommt es zu Beginn der Gifteinwirkung zunächst zu einer vorübergehenden Vermehrung der *Leukozyten*; im weiteren Verlaufe nehmen die Leukozyten aber regelmäßig ab, so daß mitunter sogar typische *Leukopenien* entstehen. Bei der akuten wie der chronischen Vergiftung sind auch eine mehr oder weniger hochgradige *Eosinophilie* (Stuhluntersuchung auf Wurmeier usw. stets negativ), *Monozytose* und eine relative *Lymphozytose* charakteristisch. Später macht sich aber auch eine Verminderung bzw. völliger Mangel an *Granulozyten (Granulozytopenie)* bemerkbar. Noch zu diesem Zeitpunkt sind aber — dies dürfte für die Frühdiagnose der Dinitro-o-kresol-Vergiftung von Bedeutung sein — weder HEINZsche Innenkörperchen noch Hämiglobin im Blute nachweisbar. Im allgemeinen treten jedoch die *Veränderungen im weißen Blutbild zeitlich früher und auffallender in Erscheinung als die entsprechenden Veränderungen im roten Blutbild.*

Während also die *morphologischen* Blutveränderungen, wenigstens zu *Beginn* einer Gifteinwirkungsperiode, bei akuter wie bei chronischer Vergiftung *zunächst gleichsinnig* verlaufen, zeigen einige der *gelösten*

Blutbestandteile ein anderes Verhalten. Hier ist der verschiedene Reaktionsablauf in der Hauptsache wohl als Ausdruck der *verschiedenen Dauer* und *Intensität* der Gifteinwirkung aufzufassen. So sind bei der *akuten* Vergiftung die *Serumcholesterinwerte* erheblich erniedrigt (wie bei einer schweren Anämie oder im Spätstadium schwerer Infektionskrankheiten). Bei der *chronischen* Gifteinwirkung ist dagegen eine so ausgesprochene Senkung des Cholesterinspiegels nicht zu beobachten; vielmehr ist diese mitunter am Ende der Einsatzperiode gegenüber den Ausgangswerten sogar leicht erhöht. Vergleicht man aber die Cholesterinwerte im Verlaufe mehrerer Jahre, so läßt sich jedoch auch hier eine deutliche Tendenz zum Absinken des Cholesterinspiegels in den späteren Jahren (1942/43) erkennen.

Viel charakteristischer ist dagegen das Verhalten der *Rest-N*-Werte bei der akuten und der chronischen Vergiftung (akute Vergiftung: Anstieg, chronische Vergiftung: Abnahme des Rest-N). Dies ist ohne Zweifel auf die Einwirkung des Dinitro-o-kresols bzw. der Dinitrophenole zurückzuführen, da sie *nur* bei den im Einsatz stehenden Mannschaften aufgetreten sind und Nierenschädigungen nicht vorgelegen haben. Man wird daher den Anstieg der Rest-N-Werte im Blut bei akuter Vergiftung nur als Folge eines gesteigerten *Eiweiß*zerfalls unter der Dinitro-o-kresol-Einwirkung auffassen können. Offenbar liegen hier ähnliche Erscheinungen vor, wie sie bei gewissen akuten Infektionskrankheiten bekannt sind (Flexner-Ruhr), die ja gleichfalls mit erheblichen azotämischen Erscheinungen einhergehen können (G. Walther[54]). Bei der chronischen Gifteinwirkung sind dagegen die Rest-N-Werte trotz ausreichender und zum Teil überreichlicher Eiweißzufuhr deutlich erniedrigt. Ob auch diese Erscheinung auf einer unmittelbaren Störung des Eiweißstoffwechsels beruht, ist unsicher, aber immerhin möglich. Sie könnte z. B. auch auf eine Schädigung des endokrinen Systems (Nebennierenrinde; s. auch Seite 644) zurückzuführen sein. Gleiches gilt wohl auch für die erhebliche Gewichtsabnahme bei denjenigen Mannschaften, die der Gifteinwirkung ausgesetzt gewesen sind.

Auch im *klinischen Bild* sind bei der akuten und der chronischen Vergiftung mit Dinitro-o-kresol bzw. Dinitrophenolen gewisse Unterschiede zu erkennen, vor allem zu Beginn der Gifteinwirkung. Während sich nämlich bei der akuten Vergiftung *sofort* Reizerscheinungen von seiten der Schleimhäute, der Augen, der Nase, des Rachens, der Bronchien mit Kopfschmerzen und Schwindelgefühl bemerkbar machen, treten bei der chronischen bzw. subakuten Gifteinwirkung derartige subjektive und objektive klinische Symptome erst relativ spät ein. Wird aber über subjektive Beschwerden wie Kopfschmerzen, abnormen Schweißausbruch usw. geklagt, so sind auch im Blutbild (besonders im weißen!) bereits entsprechende Veränderungen nachweisbar.

III. Experimentelle Untersuchungen.

Bei der ärztlichen Überwachung des mit der Schädlingsbekämpfung beschäftigten Personals war es aus verständlichen Gründen nicht möglich, genauere Unterlagen über die bei dem Verfahren zur Resorption gelangenden Giftmengen zu erhalten. Vergleichende Untersuchungen über die Intensität der Gelbfärbung der Haut durch die aromatischen Nitroverbindungen lassen den Schluß zu, daß es sich im einzelnen Falle nur um sehr geringe Mengen dieser Stoffe handeln kann, die zur Resorption gelangen; wahrscheinlich liegen die resorbierten Mengen bei wenigen Milligramm je Kilogramm Körpergewicht. Es war daher von Wichtigkeit, zunächst einmal die *kleinste Dosis* zu ermitteln, bei der überhaupt noch nachweisbare toxische Einwirkungen auf das Blut eintreten können. Weiterhin war auffallend, daß trotz erheblicher Veränderungen im Blutbild bei der Untersuchung des Personals in keinem Fall HEINZsche Innenkörperchen oder Hämiglobinbildung nachgewiesen werden konnten. Es interessierte daher die Frage, ob ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der oben geschilderten Blutveränderungen und dem Erscheinen von Innenkörperchen bzw. von Hämoglobin im Blut bestand. Außerdem mußte an die Möglichkeit gedacht werden, daß eine vorhandene, geringfügige Hämiglobinbildung sich aus zeitlichen Gründen dem Nachweis entzogen hatte, da die spektroskopischen Untersuchungen aus technischen Gründen nicht sofort an Ort und Stelle durchgeführt werden konnten. Diese Vermutung gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß nach den Untersuchungen von W. HEUBNER und M. STUHLMANN[55] der Hämiglobingehalt des Blutes innerhalb weniger Stunden bis auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes absinkt. Der sichere Nachweis des Hämiglobins gelang uns nur in einem Fall, nämlich bei einer Dinitro-o-kresol-Vergiftung mit tödlichem Ausgang derselben innerhalb 48 Std.

Diese und andere Gründe veranlassen uns, die unterste nachweisbare Wirkungsgrenze der genannten Verbindungen *(Dosis efficax minima)* im Tierversuch zu ermitteln und dabei insbesondere auf den Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Innenkörperchen im Blut unter den verschiedensten Resorptionsbedingungen zu achten.

Da die möglichen Veränderungen des Blutfarbstoffes im Sinne einer Hämiglobinbildung im weiteren Verlauf der Arbeiten gleichzeitig von W. HEUBNER und Mitarbeitern[56], R. HAVEMANN und WOLFF[57], F. JUNG[58], ferner von B. v. ISSEKUTZ[59], G. GELINSKY[60] sowie von G. KUNZ[61] bearbeitet wurden, konnten sie bei unseren Untersuchungen vorläufig unberücksichtigt bleiben, zumal hier feldmäßig bedingte Schwierigkeiten bei der Durchführung derselben bestanden. Auf Grund dieser Arbeiten über die Hämiglobinbildung war HEUBNER, entgegen der damals herrschenden Auffassung, zu dem Ergebnis gekommen, daß die bisherige Ansicht über die „kausalen Beziehungen zwischen Methämoglobin-(Hämiglobin-)bildung und tiefer greifenden Störungen der Blutbeschaffenheit, insbesondere auch der Anämien", nicht als zu Recht bestehend anerkannt werden könne.

Die Hämiglobinbildung sei zwar grundsätzlich leicht möglich, jedoch reversibel, sie führe aber an und für sich weder zur Bildung von Innenkörperchen noch zur Anämie. Ferner haben E. Gross, M. Bock und F. R. Hellrung[34] darauf hingewiesen, daß die verschiedenen Hämiglobinbildner in *wechselndem* Maße das Auftreten von Innenkörperchen verursachen können. Im übrigen sei aber die Bereitschaft zur Innenkörperchenbildung bei den *einzelnen Tierarten* verschieden und gestatte nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf die Verhältnisse beim Menschen.

Um ein Gesamtbild über den Verlauf der chronischen Vergiftung mit Dinitro-o-kresol, Dinitrophenolen und anderen aromatischen Nitroverbindungen zu erhalten, wurden experimentelle Untersuchungen in vitro sowie an Mäusen, Ratten und Kaninchen zur Feststellung der Dosis efficax minima dieser Nitroverbindungen, ihrer Wirkungsweise und der histologisch nachweisbaren Veränderungen an den einzelnen Organen durchgeführt.

a) Verhalten der Erythrozyten in vitro.

Da zu Beginn der Einwirkung der Schädlingsbekämpfungsmittel häufig anfangs ein Anstieg des Hämoglobingehaltes bei gleichzeitig relativer Abnahme der Erythrozytenzahl (Verschiebung des Färbeindex im Sinne einer hyperchromen Anämie) beobachtet worden war, mußte an die Möglichkeit einer Schädigung der Erythrozyten durch die Gifte gedacht werden, zumal auch F. Jung[62] darauf hingewiesen hatte, „daß bei Vergiftungen mit organischen aromatischen Hämiglobinbildnern Erscheinungen beobachtet werden, die nicht anders als im Sinne eines verstärkten Erythrozytenabbaues gedeutet werden können".

Bei unseren Versuchen, die wir nach der üblichen Methode der Erythrozytenresistenzbestimmung an Blutkörperchen von gesunden Menschen und Tieren sowie von Mannschaften mit deutlicher Schädigung des Blutbildes infolge Einwirkung aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt haben, ist ein Konzentrationsbereich gewählt worden, wie er nach den Versuchen von Staub und Mezeg[45] möglicherweise in praxi vorliegen konnte. Die Untersuchungen wurden sowohl bei normaler Zimmertemperatur als auch im Brutschrank (bei 37° während 24 Std) durchgeführt. Vergleichsweise wurde die Erythrozytenresistenz auch gegenüber Saponin geprüft.

Eine deutliche Verminderung der Erythrozytenresistenz ist dabei nur in einem Dosierungsbereich von 1 mg an aufwärts nachweisbar gewesen. Die bei einer Dosierung von 0,1—0,5 mg eingetretene *Resistenzerhöhung* entspricht dagegen den Befunden nach akuten Blutverlusten, bei denen ja infolge Ausschüttung jugendlicher und daher widerstandsfähiger Erythrozyten die Resistenz erhöht wird, während die bei einer Menge von über 1 mg eingetretene Resistenzverminderung eher dem Zustand bei einem hämolytischen Ikterus gleicht. Die mikroskopischen Untersuchungen der Blutkörperchen unter den gegebenen Versuchsbedingungen, mit Färbung nach Giemsa oder Pappenheim, ließen

immer eine Poikilozytose, Auftreten von Stechapfelformen und vor allem eine auffallende Aufhellung der Randzonen der Erythrozyten erkennen. Innenkörperchenbildung war nicht nachweisbar bei diesen Versuchen in vitro; ebensowenig konnte eine Hämiglobinbildung beobachtet werden.

b) Verhalten der Leukozyten (Versuche an Kaninchen).

Da die Beobachtungen am Menschen gezeigt hatten, daß die ersten sichtbaren Veränderungen des Blutbildes sich offenbar im weißen Blutbild abspielten, wurde die Frage geprüft, ob und bei welchen Dosen Dinitro-o-kresol bzw. die nitrierten Phenole nach intravenöser, perkutaner und subkutaner Verabreichung eine Veränderung der Leukozytenzahl hervorriefen.

Die Versuche wurden an 12 Kaninchen durchgeführt. Nach einer, mehrere Tage lang dauernden Beobachtung des weißen Blutbildes, wurde am 3. Versuchstag den Kaninchen die entsprechenden Injektionen von 1—5 mg je Kilogramm Körpergewicht (K.G.) Dinitro-o-kresol in wäßriger Lösung, zunächst intravenös, verabreicht. Danach wurde das Blutbild stündlich kontrolliert und gleichzeitig auch das Auftreten von HEINZschen Innenkörperchen und Hämiglobinbildung geachtet. (s. Tabelle 3).

Tabelle 3. *Kaninchen Nr. 3. 3100 g, erhält am 3. Versuchstag 9 Uhr 2 mg Dinitro-o-kresol je Kilogramm K.G. = 6,2 mg intravenös.*

Zeit	Leukozyten vor der Injektion	Leukozyten nach der Injektion	
8.00	9400	8000	HEINZsche Innenkörperchen
9.00	9000	7800 Injektion	
10.00	9800	7800	∅
11.00	9600	10400	+
12.00	9200	12000	+
13.00	8800	14000	+
nach 24 Std	8000	9200	+

Vor Versuch: Hämoglobin 90%, Erythrozyten 5620 Millionen.
Nach Versuch: Hämoglobin 90%, Erythrozyten 5400 Millionen.

Die Leukozytenzahlen zeigen übereinstimmend im Verlaufe von 2, spätestens 3 Std. nach der intravenösen Injektion einen deutlichen Anstieg, der jedoch im allgemeinen am nächsten Tag wieder abgeklungen ist. Die Leukozytenvermehrung steht dabei in entsprechender Beziehung zu dem Leukozytenstand vor dem Versuch. Bei relativ hohen Leukozytenzahlen *vor* der Injektion ist die *Leukozytose* stärker ausgeprägt als bei einem relativ niedrigen Leukozytenstand. Kaninchen, die im Verlauf einiger Wochen mehrmals zu den Untersuchungen, nach versuchsfreien Zwischenperioden, herangezogen worden sind, lassen

jedoch eine Abschwächung der Leukozytenreaktion auf die Injektion hin erkennen (Gewöhnung?). Vereinzelt findet sich auch eine geringe Zunahme der *eosinophilen Zellen*. Kontrollinjektionen mit physiologischer Kochsalzlösung verliefen ohne entsprechende Reaktionen. Die Heinzschen Innenkörperchen treten bei intravenöser Injektion meist 4—5 Std später in geringer Zahl im Blute auf. Gleichzeitig nehmen auch *Hämoglobingehalt* und die Zahl der *roten Blutkörperchen* in geringem Maße ab; besonders auffällig tritt dies am 2. und 3. Tag nach der ersten Injektion in Erscheinung. Am 5.—6. Tage nach der Injektion ist das Blutbild dagegen wieder dem Stand der Vorperiode angeglichen. Auch die Heinzschen Innenkörperchen sind dann wieder verschwunden. Das Auftreten der letzteren ist jedoch deutlich von der *Art der Verabreichung* abhängig. Während nämlich bei der *intravenösen* Darreichung die Innenkörperchen durchschnittlich 4—5 Std. nach der Injektion auftreten und längstens 5—6 Tage später wieder aus dem Blute verschwunden sind, wird bei *perkutaner* Applikation der Gifte (Einreibung der Gifte in gleicher Dosis, jedoch in Fett oder Öl gelöst, auf die rasierte Rückenhaut) das Auftreten der Heinzschen Innenkörperchen erst nach *einigen Tagen* beobachtet. Dafür sind sie dann aber auch mehrere Wochen lang im Blute nachweisbar. Die Giftwirkung bei *perkutaner* Resorption ist also infolge Depotbildung im Unterhautzellgewebe offenbar anhaltender als bei intravenöser Verabreichung, so daß die Aufnahme des Giftes durch die *Haut* eine *nachhaltigere Wirkung* erkennen läßt; sie ist daher wohl auch im Hinblick auf mögliche Spätschädigungen der Organe gefährlicher als die Giftaufnahme auf anderen Wegen.

Die *Thrombozyten* und die *Retikulozyten* zeigen keine charakteristischen Veränderungen. Gelegentlich konnte man eine Thrombozytenzunahme kurz nach der Injektion beobachten.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Versuche ist festzustellen, daß bereits eine *einmalige* Dosis von 1 mg/kg K.G. Dinitro-o-kresol oder Dinitrophenol intravenös kurz dauernde, jedoch charakteristische Veränderungen im roten und weißen Blutbild (Leukozytose, Auftreten von Innenkörperchen, Erythrozytenabbau usw.) hervorrufen kann. Die Wirkung *perkutan* verabreichter Gifte ist jedoch, bei gleicher Dosis, von stärkerer bzw. nachhaltigerer Wirkung als diejenige nach intravenöser oder peroraler Darreichung.

c) Wirkungsweise kleiner Giftmengen bei wiederholter oder länger dauernder Verabreichung (Versuche an Mäusen und Ratten).

Bei diesen Versuchsreihen erhielten jeweils 2 Tiere die gleiche Dosis verabreicht, und zwar täglich Giftmengen von 0,02 mg ansteigend bis zu 1,0 mg (je 20 g Maus oder 100 g Ratte) subkutan. Alle 3 Tage wurde das Körpergewicht kontrolliert und Blutkontrollen durchgeführt. Zur Untersuchung gelangten zunächst Dinitro-o-kresol sowie α- und β-Dinitrophenol. Nach Abschluß der Versuche wurden die

Tiere, soweit sie nicht schon vorher eingegangen waren, getötet und die wichtigsten inneren Organe histologisch untersucht*.

α) Versuche mit Dinitro-o-kresol und Dinitrophenolen an Mäusen. Die Versuche verliefen überraschend uneinheitlich. Vor allem zeigten *Gewichtskurven* und *Lebensdauer* der Tiere große Unterschiede. Die stärkste Gewichtsabnahme erfolgte, zunächst übereinstimmend, während der ersten Versuchstage. Entweder gingen die Tiere dann ein oder sie erholten sich wieder, trotz fortdauernder Giftverabreichung. Hierbei fiel besonders auf, daß die Mäuse mit den *kleinsten* Dosen früher eingingen (durchschnittliche Lebensdauer 8—10 Tage) als diejenigen, welche von Anfang an größere Giftmengen erhalten hatten. Ein Teil der letzteren überlebte 70 Tage, selbst bei einer Gesamtdosis von $10 \cdot 0{,}8$ mg bzw. $10 \cdot 1{,}0$ mg $= 40$—50 mg Dinitro-o-kresol (auf 20 g Tier berechnet). Bei diesen Tieren war auch die Gewichtsabnahme, im ganzen gesehen, am Schlusse des Versuches nur sehr gering; sie schwankte zwischen 1,0 und 1,5 g.

Hämoglobin und Erythrozyten sanken zu Beginn des Versuches deutlich im Sinne einer hypochromen Anämie ab. Diese Veränderungen waren besonders auffällig in den ersten 14 Tagen. Später machten sich Regenerationserscheinungen im Blutbild bemerkbar, so daß die Hämoglobin- und Erythrozytenwerte dann teilweise wieder anstiegen.

Die *histologischen* Veränderungen betrafen vor allem Leber, Milz, Nebennieren und Knochenmark. Übereinstimmend fanden sich in der *Leber* toxische Verfettung der Kupfferschen Sternzellen sowie Rundzelleninfiltrate im Glisson, Hämosiderinablagerungen und Thrombosen in Pfortaderästen; in der *Milz* sehr häufig Verfettung der Retikulumzellen, teilweise auch reichlich Riesenzellen. Die *Nieren* enthielten vielfach bluthaltige Glomeruli und verquollene Kanälchen; die *Nebennieren* wiesen eine mehr oder weniger ausgesprochene Verarmung an Lipoiden in der Rinde auf. Das *Knochenmark* war hyperämisch und gut blutbildend; vielfach fanden sich Knochenmarksriesenzellen. Das *Herz* war meist kontrahiert und blaß; die *Lungen* wiesen manchmal ein geringgradiges Emphysem oder Ödem auf. Die übrigen Organe (Magen-Darmkanal, Genitalien) zeigten keine besonderen Veränderungen.

Analoge Ergebnisse wurden bei den Versuchen mit α- und *β-Dinitrophenol* erhalten. Auch hier war das unterschiedliche Verhalten des Körpergewichtes und der Lebensdauer sehr auffallend, wobei wiederum die Mäuse mit den relativ größten Dinitrophenolgaben durchschnittlich erheblich länger lebten und auch im Endergebnis eine geringere Gewichtsabnahme zeigten als die Mäuse mit kleinen Giftgaben. Es scheint

* Die Untersuchungen wurden in liebenswürdiger Weise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Schaetz, dem Direktor des Pathologischen Instituts am Augusta-Viktoria-Krankenhaus in Berlin-Schöneberg, vorgenommen.

also, als ob mit der Zeit, wenn die Tiere den ersten Giftschock überstanden haben, eine gewisse Giftresistenz eintritt. Blutbild und histologische Untersuchungen der Organe ergaben gleichartige Befunde wie bei Dinitro-o-kresol.

β) Versuche an Ratten. Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie unter α).

Auch hier machten sich ähnliche Erscheinungen im Verhalten des Körpergewichtes, der Lebensdauer und im Blutbild bemerkbar: anfangs starke Gewichtsverluste, die bei kleinen Gaben stärker ausgesprochen waren wie bei den größeren Giftmengen. Die Verkürzung der Lebensdauer stand wiederum in umgekehrtem Verhältnis zu der Größe der Dosis (Versuche mit Dinitro-o-kresol und α- und β-Dinitrophenol).

Hämoglobingehalt und Erythrozyten nahmen vom 1. Versuchstage an deutlich ab. Im weißen Blutbild erfolgte spätestens am 2. Tage nach der Injektion eine auffallende Leukozytose (bis zu 17000 und 18000), auch Heinzsche Innenkörperchen waren fast immer vom 2. Versuchstag an nachweisbar (subkutane Injektion). Herz und Nieren zeigten im allgemeinen die geringsten Veränderungen. Im *Herzen* waren gelegentlich geringe Rundzelleninfiltrate an der Vorhofkammergrenze zu beobachten; bei den langlebigen Tieren manchmal auch beginnende Verfettungserscheinungen. Die *Nieren* zeigten vereinzelt geringe Stauungserscheinungen. Anders verhielten sich dagegen die *Nebennieren,* bei denen wiederum sehr häufig, besonders bei längerer Dauer der Versuche, ein Lipoidschwund in der Rinde (von außen nach innen) eingetreten war. Ratten, die sehr lange (30 Tage) der Gifteinwirkung ausgesetzt gewesen waren, zeigten zum Teil *völligen Lipoidschwund* in der Nebennierenrinde. In der *Lunge* bestanden häufig Hyperämieerscheinungen und Rundzellenherde in der Umgebung von Bronchien und Gefäßen. Auch in der *Leber* fanden sich vielfach Rundzelleninfiltrate im Glisson, mitunter feintropfige Verfettung der Intermediärzone der Läppchen sowie der Kupfferschen Sternzellen. Die *Milz* war meist sehr blutreich; in den Keimzentren der großen Follikeln lagen geringe oder stärker ausgeprägte Karyorrhexie- und Phagozytoseerscheinungen vor. Bei den langlebigen Tieren bestand ferner eine starke *Hämosiderosis* in der Pulpa. Das *Knochenmark* war meist blutreich und enthielt zum Teil verklumpte Riesenzellen; im übrigen war eine starke *Leukopoese* nachweisbar.

Die Ergebnisse der Versuche mit Dinitro-o-kresol und α- und β-Dinitrophenol an Ratten (bei subkutaner Darreichung) stehen also in guter Übereinstimmung mit denjenigen der Versuche an Mäusen bzw. an Kaninchen: Vom 2. Tage an Auftreten von Heinzschen Innenkörperchen und *Leukozytose.* Von den Organen sind am stärksten betroffen Leber, Milz und Nebennierenrinde. Auffallend ist auch hier wiederum, daß die

Lebensdauer der mit kleinen Dosen vergifteten Tiere durchschnittlich kürzer gewesen ist als diejenige der Ratten mit großen Giftmengen. Beispielsweise überlebten Ratten mit insgesamt 60 mg Dinitro-o-kresol 43 Tage lang und solche mit 30 mg 27 Tage, während Tiere mit 8,8 mg und mit 2,3 mg Dinitro-o-kresol bereits am 13. oder 9. Versuchstage eingegangen waren. Zum *Leukozytenbild* ist noch zu bemerken, daß, abgesehen von der Leukozytose, später eine Abnahme der Leukozyten bis zur Norm eintrat; eine ausgesprochene Leukopenie war jedoch nie festzustellen. Im Differentialbild fanden sich jedoch gelegentlich eine Granulozytopenie. *Thrombozyten-* und *Retikulozytenz*ahlen nahmen anfangs etwas ab, später zu. Das Verhalten dieser Blutbestandteile war jedoch sehr uneinheitlich. — Dinitro-o-kresol wie α- und β-Dinitrophenol lassen im allgemeinen keine wesentlichen Wirkungsunterschiede erkennen. Es hat jedoch den Anschein, als ob das Dinitro-o-kresol die Leber stärker schädigt als die Dinitrophenole. Vor allem treten beim Dinitro-o-kresol wesentlich häufiger und stärker Verfettungserscheinungen in den Kupfferschen Sternzellen, manchmal auch in den übrigen Leberzellen auf als bei den Dinitrophenolen. Von letzteren wirkt das α-Dinitrophenol offenbar wiederum stärker auf die *Leber* als das β-Dinitrophenol. Die Milzbefunde sind bei den einzelnen Giften qualitativ völlig übereinstimmend; mit einiger Zurückhaltung kann man aber auch hier eine stärkere Wirkung des Dinitro-o-kresols wie der Dinitrophenole feststellen, wobei von letzteren wiederum das α-Dinitrophenol toxischer ist als das β-Dinitrophenol.

Die auffallendsten Veränderungen treten aber in der *Nebennierenrinde* auf. Die Nebenniere scheint dasjenige Organ zu sein, das neben der Leber am stärksten betroffen wird.

d) Wirkungsweise wiederholter, kleiner Giftmengen bei Kaninchen und Katzen.

Da die Versuchsserien an kleinen Tieren (Mäusen und Ratten), sowohl im ganzen gesehen als auch hinsichtlich der Gifteinwirkung auf das Blut, nur ungenügenden Aufschluß geben konnten, wurden die Versuche an größeren Tieren in entsprechender Anordnung wiederholt. Hierbei wurde den Kaninchen Dinitro-o-kresol bzw. α- oder β-Dinitrophenol oder p-Nitrophenol in 1/10 molarer wäßriger Lösung und in Mengen von 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,4, 1,0, 2,0, 3,0 und 5,0 mg je Kilogramm K.G., teils intravenös, teils subkutan verabreicht; in einer weiteren Versuchsreihe wurde das Gift mit Adeps lanae cum aqua in die rasierte Rückenhaut eingerieben. Außerdem erhielten noch 2 Katzen je 20 bzw. 40 mg/kg K.G. Dinitro-o-kresol in wäßriger Lösung subkutan täglich, um zum Vergleich auch einige Vergiftungsbilder mit größeren Giftmengen zu erhalten. Die Versuche sollten ursprünglich noch mit o- und m-Nitrophenol sowie mit anderen Nitroverbindungen erweitert werden; dies war jedoch infolge der Zeitumstände nicht mehr möglich. Bei den einzelnen Tieren wurden jeweils der Blutstatus und das Auftreten von Heinzschen Innenkörperchen sowie das Körpergewicht, in einzelnen Fällen auch der Blutzuckergehalt, untersucht. Der Urin wurde insbesondere auf die Aus-

scheidung von Urobilinogen, Indikan, Eiweiß, Zucker sowie auf Kreatininausscheidung geprüft.

Aus der Zusammenstellung der Versuche (Tabelle 4) ergibt sich wiederum, daß *Hämoglobingehalt* und *Erythrozytenzahl* bei der wiederholten intravenösen wie bei der perkutanen Verabreichung langsam, aber stetig abgesunken sind. Da aus technischen Gründen eine Kontrolle der Leukozytenzahl nur alle 3—4 Tage vorgenommen werden konnte, entzogen sich offenbar die am Anfang vorübergehend auftretenden Leukozytosen, wie sie eingangs beschrieben wurden, der Beobachtung. Im weiteren Verlauf der Versuchsperiode nahmen die Leukozyten auch bei relativ großen Giftdosen nur verhältnismäßig langsam ab. Bei der *perkutanen* Darreichung trat dagegen anfangs eine außerordentlich starke und lang anhaltende *Leukozytose* auf. Ähnliche Unterschiede ergaben sich im Auftreten der Heinzschen Innenkörperchen. Diese waren bei der intravenösen Applikation erstmals zwischen dem 2. und 17. Versuchstag nachweisbar; sie blieben durchschnittlich mehrere Wochen lang im Blute anwesend, besonders lange bei einer Dosis von 3—5 mg/kg täglich. Ganz anders verhielten sich die Heinzschen Innenkörperchen bei der *perkutanen* oder *subkutanen* Darreichung der Gifte. Hier traten die Heinzschen Innenkörperchen erst relativ spät im Blut auf, blieben dafür aber sehr lange nachweisbar, in einem Falle sogar noch 50 Tage lang nach Abschluß der Versuchsperiode. Im *Urin* waren vorübergehend Urobilinogen und Indikan, vereinzelt auch eine vermehrte *Kreatinin*ausscheidung festzustellen. Die mit relativ großen Dosen von Dinitro-o-kresol vergifteten Tiere schieden auch mehrmals, längere Zeit hindurch, *Zucker* im Urin aus. Der Blutzuckerspiegel zeigte jedoch keine pathologische Verschiebung.

Bei den Katzen traten die Heinzschen Innenkörperchen bereits vom 2. Versuchstag an auf. *Hämoglobin* und die Zahl der *roten Blutkörperchen* nahmen mit der Zeit zum Teil sehr erheblich ab, die Leukozyten vermehrten sich dagegen etwas.

Auffallend war auch hier das Verhalten des *Körpergewichts*. Während die Kaninchen im allgemeinen, zum Teil sogar erheblich, an Gewicht zunahmen, besonders stark wiederum diejenigen Tiere, welche die größeren Giftgaben erhalten hatten, war bei der einen jungen und relativ kleinen Katze eine deutliche Gewichtsabnahme von 20% des Ausgangsgewichts eingetreten. Bei der anderen Katze blieb die Gewichtskurve im wesentlichen konstant. Es ergab sich also auch bei den größeren Versuchstieren wiederum dasselbe Bild wie bei den Mäusen und Ratten, daß bei den relativ großen Giftgaben nach vorübergehender Gewichtsabnahme eine deutliche Gewichtszunahme erfolgte, während bei den kleinen Giftgaben das Gewicht anfangs mehr oder weniger stark abfiel und danach ziemlich konstant blieb.

Tabelle 4. *Versuche mit Dinitro-o-kresol, α- un*

Nr.	Kaninchen Nr.	Anfangsgewicht g	Endgewicht g	Gewichtsveränderung g	Dosis mg/kg intravenös	Dosis mg/Tier intravenös	Zahl der Injektionen	Gesamtdosis mg	Innenkörperchen Tag
									A. Dinitro
1	13	2470	2470	± 0	0,01	0,025	14	0,35	9.—22.
2	10	2470	2580	+ 110	0,02	0.05	14	0,7	17.—18.
3	12*	2130	2100	— 30	0,1	0,22	14	3,08	4.—17.
4	11*	2560	2690	+ 130	0,2	0,50	14	7,0	10.—20.
5	14	2570	2900	+ 330	1,0	2,6	14	3,64	6.—14.
6	15*	3100	3700	+ 700	2,0	6,2	14	86,8	2.—12.
7	16*	2780	3250	+ 470	3,0	8,4	28	233,2	5.—50.
8	17*	3000	3600	+ 600	5,0	15,0	26	840,0	6.—68.
									B. β-Dinitro
9	18	2730	3120	+ 390	0,2	0,6	55	33	7.—66.
10	19	2760	3450	+ 690	0,4	1,2	45	54	4.—52.
11	20*	2500	2500	± 0	1,0	2,5	40	100	6.—40.
12	24*	2480	2530	+ 50	2,0	5,0	45	225	6.—50.
									C. Dinitro
13	Katze Nr. 1	1020	1100	+ 80	20 subkutan	20	40	800	2.—50.
14	Katze Nr. 2	1050	850	— 200	40 subkutan	40	21	840	2.—24.

* Leukozytenwerte starken Schwankungen unterworfen.

Die Versuche mit α- *und β-Dinitrophenol* sowie mit *p-Nitrophenol* lieferten im ganzen ähnliche Ergebnisse. Besondere qualitative oder quantitative Abweichungen von dem Vergiftungsbild des Dinitro-o-kresols waren nicht festzustellen.

Die *histologische Untersuchung* der einzelnen Organe von den eingegangenen oder am Ende der Versuchsperiode getöteten Kaninchen ergab relativ geringfügige pathologische Veränderungen. Auch hier waren wiederum besonders die *Nebennieren,* die *Leber* und die *Milz* verändert. Trotz der langen Versuchsdauer und der verhältnismäßig großen Giftdosen waren die Veränderungen qualitativ wie quantitativ durchschnittlich schwächer ausgeprägt als bei den Mäusen und Ratten; dies kann aber wohl dadurch erklärt werden, daß die Mäuse und Ratten meist eine relativ höhere Gesamtdosis erhalten hatten als die Kaninchen (Mäuse bis zu 2000—2500 mg/kg K.G., Ratten bis zu 500—600 mg/kg K.G.).

Kaninchen Nr. 16. Insgesamt 28 Injektionen von je 3,0 mg/1000 g intravenös (84 mg/1000 g insgesamt) Dinitro-o-kresol. Vorübergehende Indikan- und Zucker-

β-Dinitrophenol an Kaninchen und Katzen.

Diazo-Reaktion Tage	Kreatininausscheidung Tage	Hämoglobin Höchststand Tiefstand	Erythrozyten Höchststand Tiefstand in Millionen	Leukozyten Höchststand Tiefstand	Bemerkungen *
o-kresol.					
9.—17.	14.—19.	75—60	4,6—3,8	8000—5800	Urin am 23. Tag Urobilinogen +,
9.—18.	0	85—58	5,5—3,8	9800—5000	o. B.
9.-17.	0	80—60	4,6—3,8	9000—6000	o. B.
8.—17.	0	81—58	5,1—3,6	9600—5000	o. B.
am 17.	16.—21.	79—60	4,9—3,9	9000—6800	16.—18. Tag, Indikan +
1.—8.	0	84—68	4,9—4,2	8400—6400	am 14. Versuchstag durch Unfall †
7.—50.	0	89—68	4,9—4,7	8400—5800	Urin ab 20. Tag: Indikan +, Zucker ++
6.—68.	0	88—80	4,9—4,9	9400—7200	Urin ab 14. Tag: Indikan +, Zucker ++
phenol.					
o. B.	nicht bestimmt	90—72	4,5—3,7	8000—5500	Nie ausgesprochene Leukopenie. Gallenfarbstoffe +
o. B.	dgl.	90—75	4,6—4,0	8000—6000	60.—64. Tag, Zucker: 6, 7. und 60. Tag
o. B.	0	92—76	5,1—4,3	9200—7200	Gallenfarbstoffe: 48. Tag, 52. Tag Aceton +
o. B.	0	90—82	5,0—4,3	8900—7600	Gallenfarbstoffe +, 32.—38. Tag, Zucker +, 36.—39. Tag, Aceton +, 36.—37. Tag
o-kresol.					
—	—	80—58	4,5—3,9	8600—6000	nach 40. Injektion getötet
nicht untersucht		80—70	4,5—3,9	8000—4800	nach 21. Injektion gestorben

ausscheidung im Urin. *Herz:* Blutgefüllter Ventrikel, geringe Fettdurchwachsung. *Lunge:* Hyperämie und herdförmiges Emphysem, peribronchiale Infiltrate. *Leber:* Gute Glykogenspeicherung, keine Verfettung, auch nicht in den Kupfferschen Sternzellen. *Milz:* Reichlich Follikel mit Keimzentren, gute Blutanschoppung der Pulpa. *Nieren:* Glomeruli bluthaltig, keine Schwellung der gewundenen Kanälchen. *Nebennieren:* Geringer Lipoidschwund. Die übrigen Organe o. B.

Kaninchen Nr. 17. Insgesamt 56 Injektionen von je 5,0 mg/1000 g (280 mg je 1000 g insgesamt) Dinitro-o-kresol intravenös. Vorübergehende Indikan- und Zuckerausscheidung im Urin. *Herz:* Geringe Fettdurchwachsung an der Oberfläche. *Lunge:* Herdförmiges Emphysem und Rundzelleninfiltrate an den Bronchien. *Leber:* Geringe zentrale Stauung, starke Erweiterung der Lebervenen, herdförmige Infiltrate im Glisson, keine Verfettung, auch nicht in den Kupfferschen Sternzellen. *Milz:* Mittlerer Blutgehalt der Pulpa, reichlich Follikel. Geringe Hämosiderosis. *Nieren:* Bluthaltige Glomeruli, keine Fetteinlagerung. *Nebennieren:* Mäßiger Lipoidgehalt. *Hoden:* Spermatogenese, im Nebenboden reichlich Spermatozoen. *Knochenmark:* Fett- und blutbildendes Mark in gleicher Menge. Die übrigen Organe o. B.

Von den beiden jungen Katzen starb eine nach der 21. subkutanen Injektion von je 40 mg Dinitro-o-kresol je Kilogramm (insgesamt 840 mg) unter Erbrechen und Krämpfen. Bei diesem Tier war das Gewicht um 20% gegenüber dem Ausgangsgewicht abgesunken. Schwerere Veränderungen im Blutbild waren nicht nachweisbar. Bei der Sektion fiel auf, daß das noch vorhandene Körperfett

überall intensiv gelb gefärbt war. Die Herzmuskulatur war nicht verfettet, die Lungen waren schlaff, auffallend blutleer und blaß. Es bestanden einige Emphysemherde, jedoch keine Blutstauungen oder Ödeme. Die Leber wies keine Verfettungserscheinungen auf. Die sehr blassen Nieren zeigten dunkelrote Rindenmarksgrenzen mit herdförmigen Rundzelleninfiltraten. Die Glomeruli waren sehr zellreich und bluthaltig, die Kanälchen etwas verquollen und gewunden. Verfettungsherde fanden sich an mehreren Stellen der Rindenmarksgrenzen. Die Knochen zeigten gut blutbildendes Mark. Analoge Befunde wurden bei der anderen Katze erhoben, die, nachdem sie 40 · 20 mg = 800 mg Dinitro-o-kresol subkutan erhalten hatte, nach Abschluß des Versuches getötet worden war. Der Hämoglobingehalt war bis durchschnittlich 58% abgesunken, die Zahl der Erythrozyten auf 3,9 Millionen zurückgegangen.

Bei der Sektion erwies sich auch hier das Körperfett, besonders unter dem Sternum, auffallend gelb verfärbt. — Die Sektionsbefunde und die histologischen Untersuchungen der Organe bei den mit α- und β-Dinitrophenol sowie mit p-Kresol vergifteten Kaninchen entsprachen im wesentlichen denjenigen der Dinitro-o-kresol-Tiere.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Vergleicht man die Befunde bei der akuten und subakuten Vergiftung von Menschen, Katzen, Kaninchen, Ratten und Mäusen mit Dinitro-o-kresol, α- und β-Dinitrophenol bzw. p-Nitrophenol, so fällt zunächst auf, daß die akute und die chronische Vergiftung beim Menschen durchaus verschieden verlaufen. Bei der *akuten Vergiftung* kommt es zunächst zu schweren Reizerscheinungen von seiten der Schleimhäute (Augen, Nase, Rachen, Bronchien usw.) und im Blute zu einem auffallenden *Anstieg des Rest-N-Spiegels* sowie gleichzeitig zu einem deutlichen, wenn auch weniger ausgesprochenen *Absinken des Cholesterinspiegels*. — *Im roten Blutbild* steigen die Hämoglobinwerte zunächst an, so daß der Färbeindex überhöht wird; im *weißen Blutbild* kommt es nach einer vorübergehenden *Leukozytose* zu einer teilweisen erheblichen *Leukopenie*. Bei der *chronischen Vergiftung* fehlen dagegen die Reizerscheinungen von seiten der Schleimhäute fast völlig. Die *Rest-N-Werte* waren meist *erniedrigt* (eine gelegentlich beobachtete außerordentliche Erhöhung desselben war wohl als Ausdruck eines akuten Reizes aufzufassen) und ebenso nahmen die *Cholesterinwerte* des Serums langsam, aber stetig im Laufe der Jahre bei wiederholter Gifteinwirkung ab, obwohl die Ernährungsbedingungen unverändert dieselben geblieben waren. In gleichem Maße sank auch das Körpergewicht ab. — Zieht man zum Vergleich die Ergebnisse der Tierversuche heran, so macht man hier analoge Beobachtungen, die, teilweise wenigstens, eine Erklärung für die Erscheinungen der Vergiftung am Menschen bieten können. So ist besonders auffallend, daß bei entsprechend langdauernder Verabreichung kleinerer oder größerer Giftmengen charakteristische Organveränderungen auftreten, die in erster Linie die *Nebennierenrinde* (Lipoidschwund), in zweiter Linie *Leber, Milz* und *Knochenmark* betreffen. Diese

Veränderungen stehen deutlich in Abhängigkeit zur Dosis der Gifte. Die bei der chronischen Dinitro-o-kresol-Vergiftung eintretende Senkung des Cholesterin- und des Rest-N-Spiegels ist zweifellos als Ausdruck einer toxischen Schädigung der Leber (Cholesterinstoffwechsel, Cholesterinester!) bzw. der Nebennierendenrinde (Nebenierenrindenhormon! Störung des endokrinen Apparates—Zuckerausscheidung) zu werten. In diesem Sinne sprechen auch die stetige Gewichtsabnahme und die subjektiven Symptome der Schwäche, Müdigkeit, Kopfschmerzen usw. (Kreislaufschwäche infolge Nebennierenschädigung!). Die bei der akuten Vergiftung dagegen eintretende, auffallende Erhöhung des Rest-N-Spiegels ohne nachweisbare Nierenschädigung dürfte wohl auf einen enorm gesteigerten Abbau von Körpereiweiß zurückzuführen sein (erhöhte Kreatininausscheidung bei Kaninchen!).

Hierfür sprechen auch neuere Untersuchungen von A. v. Jeney[63, 64, 65], von M. v. Harangozo-Orossy und B. v. Issekutz jr.[66], A. Lardy und H. Philipps[67] u. a. mehr, die bei Dinitrophenolwirkung auf den Warmblüter eine Zu- oder Abnahme des Sauerstoffverbrauches der Zellen, je nach Konzentration des Giftes, beobachtet haben. 12 mg je Kilogramm K.G. 1, 2, 4-Dinitrophenol konnten bei Ratten eine Erhöhung des Atmungsstoffwechsels bis zu 52,3% und gleichzeitig Hyperthermie hervorrufen. Bei Hunden wurden nach 12 mg/kg K.G. Dinitrophenol intravenös eine Vermehrung der Blutmilchsäure (+ 53,7% beim wachen und + 122% beim mit Pernocton narkotisierten Hund), Temperaturerhöhungen (bei Hunden bis zu 45° C, bei Tauben bis 50° C), Polypnoe, gesteigerte Wärmeabgabe, lebhafterer Gasstoffwechsel, sowie Hypoglykämie festgestellt. Es finden sich also hier analoge Veränderungen im Eiweißstoffwechsel wie beim Fieber (siehe auch C. Heymans und J. J. Boukart[68]). Das Dinitrophenol wird daher als *Katalysator des Zellstoffwechsels* und der *Wärmeproduktion* aufgefaßt. Der Angriffspunkt der die Wärmeproduktion steigernden Vorgänge soll jedoch dabei nicht in der Schilddrüse, sondern in der Peripherie zu suchen sein. — Hyperglykämie tritt dagegen nur bei Anwesenheit genügender Glykogenmengen auf (Cutting, W. C. Rytannek und M. L. Tainter[69] sowie Wichnofsky, Kane, Shlevin und Byron[70]). Auch die Stellung der Nitrogruppen im Molekül ist dabei wahrscheinlich von einem gewissen Einfluß, denn nach R. Jonnard[71] verursachen Orthoabkömmlinge Temperatursenkung, Paraabkömmlinge dagegen Temperaturerhöhung (Dosierung?).

Auf Grund unserer Beobachtungen und dieser Untersuchungen wird man also bei der qualitativ gleichartigen Wirkungsweise der aromatischen Nitroverbindungen annehmen dürfen, daß auch bei der akuten Dinitro-o-kresol-Vergiftung ähnliche Veränderungen des Eiweiß- und Fettstoffwechsels auftreten können (Anwendung als Entfettungsmittel in Amerika!). So würden demnach die hier beschriebenen Erscheinungen zwanglos durch einen gesteigerten Eiweißabbau in der Zelle bzw. im Organismus gedeutet werden können. Auch das Verhalten der geformten Blutbestandteile bzw. die charakteristischen Verschiebungen im *roten und weißen Blutbild* bei der akuten bzw. subakuten oder chronischen Vergiftung finden auf Grund der Tierversuche eine einleuchtende Erklärung. Die bei der akuten Vergiftung anfangs auftretende Zunahme des

Hämoglobingehalts (Erhöhung des Färbeindex über 1) bei relativer Abnahme der Erythrozyten ist wohl zunächst durch einen entsprechenden Abbau roter Blutkörperchen (Resistenzverminderung) bedingt. Später kommt es jedoch zu einer deutlichen Senkung des Hämoglobingehalts sowie der Erythrozytenzahl im Sinne einer *hypochromen Anämie,* die bei der chronischen Vergiftung zum Teil erhebliche Ausmaße annehmen kann. Dieser gesteigerte Erythrozytenabbau (Hämosiderosis der Milz!) kann möglicherweise auch ursächlich an der vorübergehenden Erhöhung des Cholesterinspiegels beteiligt sein. Da aber das Knochenmark fast stets (falls die Vergiftung nicht zu weit vorgeschritten ist) hyperämisch gefunden wird, kann man wohl mit einer schnellen Regeneration des Blutes rechnen.

Schwerwiegender scheinen die Verschiebungen im *weißen Blutbild* zu sein. Die zu Beginn der Vergiftung eintretende *Leukozytose,* die als Ausdruck eines *erstmaligen* Knochenmarkreizes aufzufassen ist, wird bald, besonders bei Vergiftungen mit größeren Giftmengen, von einer *Leukopenie,* zum Teil auch einer *Granulozytopenie* (Agranulozytose) abgelöst. Da diese Veränderungen charakteristischer sind als diejenigen im roten Blutbild und zudem sehr frühzeitig auftreten, bilden sie ein wichtiges *Frühsymptom* der Vergiftung mit aromatischen Nitroverbindungen, um so mehr, als zu dieser Zeit, besonders bei resorptiver Vergiftung durch die Haut, HEINZsche *Innenkörperchen* ebensowenig nachweisbar sind wie eine etwa vorhandene, geringgradige *Hämiglobin*bildung. Das Auftreten der Innenkörperchen ist nämlich nicht nur, wie GROSS und Mitarbeiter gezeigt haben, von der Tierart abhängig, sondern auch in erheblichem Umfang von der *Art der Einverleibung des Giftes,* da sie bei *perkutaner* Resorption wesentlich später auftreten wie bei intravenöser Darreichung. Diese Beobachtung bietet auch eine Erklärung dafür, daß wir während der relativ kurz dauernden Einsatzperioden von Menschen zur Schädlingsbekämpfung (Dauer 2—3 Wochen) weder zu Beginn noch zu Ende der Einsatzperiode HEINZsche Innenkörperchen nachweisen konnten.

Möglicherweise können HEINZsche Innenkörperchen und Hämiglobin im Blute auch bei der *akuten* Vergiftung auftreten. In dem eingangs erwähnten Falle war damals wegen des raschen Ablaufes der Vergiftung der Nachweis nicht gelungen. Ein positiver Hämiglobinnachweis gelang nur einmal bei einer Dinitro-o-kresol-Vergiftung mit tödlichem Ausgang. Diese Vergiftung war dadurch eingetreten, daß der betreffende Beobachter (ein etwa 45jähriger Mann) einen frisch mit Dinitro-o-kresol bestäubten Wald ohne Schutzmaßnahmen im Auto durchquert hatte, wonach innerhalb 48 Std nach der Einatmung des Giftes schwere Herzanfälle mit plötzlichem Herztod auftraten. Hier war die Hämiglobinreaktion allerdings auffallend stark ausgefallen.

Wie viele Gifte, so lassen auch die aromatischen Nitroverbindungen in kleinsten Gaben umgekehrt gewisse *zellstimulierende* Eigenschaften erkennen. Diese ergeben sich nicht nur aus den Versuchen an Tieren (Leukozytose bei Kaninchen nach intravenöser Injektion), sondern sie lassen sich auch in eindrucksvoller Weise in Versuchen an Pflanzenteilen sowie an keimenden Samen beobachten. Wenn man z. B. Zweige mit Blatt- und Blütenknospen von Pirus malus usw. in Wasser bringt, das 1/100, 1/10 und 1,0 mg Dinitro-o-kresol bzw. Dinitrophenol usw. in 1 Liter enthält, so erfolgt der Aufbruch der Blüten und Blattknospen erheblich rascher als bei den entsprechenden Kontrollen mit reinem Leitungswasser, während bei einer Dosierung von über 1 mg Dinitro-o-kresol je Liter Wasser (1:1 Million) die Blüten- und Blattknospenschwellung und der Knospenaufbruch erheblich verzögert bzw. gehemmt wird. Analoge Ergebnisse lieferten auch Keimversuche mit Getreidesamen (Roggen, Weizen, Hafer) sowie Versuche über die Beeinflussung der Enzymtätigkeit der Pflanzenzellen an Kartoffelprismen. Die aromatischen Nitroverbindungen können somit in kleinsten Gaben und Konzentrationen (unter 1:1 Million) als *Hochleistungsstoffe* im Sinne von F. Boas[72] wirken. Diese Beobachtungen bilden wohl einen weiteren Beleg dafür, daß die aromatischen Nitroverbindungen als Katalysatoren des Zellstoffwechsels wirken können, sofern sie nur in Konzentrationen angewandt werden, die unterhalb der toxischen Grenzkonzentration liegen.

Die in vivo wie in vitro ermittelten Reaktionen des Dinitro-o-kresols und der Dinitrophenole bzw. des Nitrophenols, ergeben somit in großen Zügen eine *zellstimulierende* Wirkung dieser Gifte unterhalb einer Grenzdosis von 0,1—1,0 mg/kg K.G., eine *zelltoxische* Wirkung dagegen oberhalb dieses Dosierungsbereiches. In letzterem Falle finden sich Strukturveränderungen im Parenchym der Organe mit Verfettung der Parenchymzellen, wie sie z. B. auch für allgemeinen Sauerstoffmangel, z. B. bei schwerer Anämie, CO-Vergiftung, Höhenkrankheit usw. charakteristisch sind (F. Büchner[73]). Die toxische Wirkung der aromatischen Nitroverbindungen bei Dosen über 1,0 mg je Kilogramm K.G. wird man also möglicherweise als Folge einer Hypoxämie auffassen können.

Zusammenfassung.

Die experimentellen und klinischen Beobachtungen über die toxischen Eigenschaften einiger aromatischer Nitroverbindungen (Dinitro-o-kresol, α- und β-Dinitrophenol und p-Nitrophenol) zeigen beim Menschen einen verschiedenen Ablauf der akuten und der subakuten bzw. chronischen Vergiftung.

Bei der *akuten Vergiftung* mit Dinitro-o-kresol, die mit schweren Reizerscheinungen der Schleimhäute, insbesondere der Augen, der Nase, des Rachens und der Bronchien einhergeht, finden sich im Blute eine außerordentliche Erhöhung des Rest-N-Spiegels und eine relative Abnahme des Cholesterinspiegels. Die Hämoglobinwerte sind anfangs überhöht, die Erythrozyten in geringem Grade vermindert. Im weißen Blutbild kommt es, je nach Intensität und Dauer der Vergiftung, zu einer Leukozytose oder zu einer Leukopenie.

Bei der *chronischen* bzw. *subakuten Vergiftung* mit diesen Verbindungen erfolgt dagegen allmählich eine Abnahme der Rest-N-Werte sowie des Cholesterinspiegels. Gleichzeitig entsteht eine *hypochrome Anämie*, die bei längerer Dauer und Intensität der Vergiftung erhebliche Ausmaße erreichen kann. Heinzsche Innenkörperchen und Hämiglobin sind dabei jedoch nicht zu beobachten. Ausgesprochene Hämiglobinbildung deutet auf eine weit fortgeschrittene chronische bzw. auf eine stärkere akute Vergiftung hin. Fehlen von Hämiglobin und Heinzschen Innenkörperchen im Blut kann also nicht als Gegenbeweis für eine etwa *beginnende* Vergiftung gelten. Hämiglobin und Heinzsche Innenkörperchen stehen offenbar auch nicht in kausalem Zusammenhang und sind zeitlich hinsichtlich ihres Auftretens voneinander unabhängig.

Die experimentellen Versuche (Mäuse, Ratten, Kaninchen und Katze) bestätigten die klinische Beobachtung, daß die *ersten* sichtbaren Veränderungen als Folge einer subakuten Gifteinwirkung im *weißen* Blutbild auftreten. Hier kommt es, als Ausdruck einer gesteigerten Leukopoese bzw. einer Knochenmarksreizung, zunächst zu einer Leukozytose und später zu einer Leukopenie.

Heinzsche *Innenkörperchen* treten bei subkutaner und intravenöser Giftverabreichung bei den Versuchstieren (Kaninchen) meist innerhalb weniger Stunden nach der Injektion auf. Bei *perkutaner* Einverleibung der Gifte jedoch sind diese oft erst nach Tagen bzw. Wochen im Blute nachweisbar. Die erhebliche Verzögerung des Auftretens von Innenkörperchen bei perkutaner Resorption liefert eine Erklärung für unsere diesbezüglichen negativen Befunde am Menschen.

Histologisch lassen die Versuchstiere deutliche Schädigungen der *Milz*, der *Leber* und vor allem der *Nebennierenrinde* erkennen. Letztere ist am stärksten betroffen (Lipoidschwund). In der Leber liegen häufig Verfettungserscheinungen, namentlich in den Kupfferschen Sternzellen, vor.

Körpergewicht und *Lebensdauer* verhalten sich bei allen Tierarten atypisch. Die mit kleinen Giftmengen behandelten Tiere nehmen an Gewicht ab und sterben meist rasch, während die mit größeren Dosen vergifteten Tiere nach einiger Zeit zunehmen und meist lange überleben (Gewöhnung?). Es ergibt sich somit die paradoxe Erscheinung, daß kleine Mengen aromatischer Nitroverbindungen toxischer bzw. letaler wirken können als größere Dosen. — Die untere toxische Grenzkonzentration für die aromatischen Nitroverbindungen ist nach unseren bisherigen Versuchen mit etwa 0,1—1,0 mg/kg (Warmblüter) anzunehmen.

Literatur.

[1] Flury, F., u. W. Zangger: Lehrbuch der Toxikologie. Berlin: Springer 1928. [2] Taeger, H.: Die Klinik der entschädigungspflichtigen Berufskrankheiten. Berlin: Springer 1941. — [3] Bauer, M., H. Engel, F. Koelsch, J. Krohn u. H. Lauterbach:

Arb. Gesdh. **1937**, H. 29. — [4] Müller, R.: Allgemeine Hygiene. München-Berlin: J. F. Lehmann 1944. — Medizinische Mikrobiologie. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1946. — [5] Weyher, F., u. F. Zumpt: Grundriß der medizinischen Entomologie. Leipzig: J. A. Barth 1941. — [6] Martini, E.: Lehrbuch der medizinischen Entomologie, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1946. — [7] Zumpt, F.: Die Tsetsefliegen. Jena: Gustav Fischer 1936. — [8] Eidmann, H.: Lehrbuch der Entomologie. Berlin: P. Parey 1941. — [9] Schwerdtfeger, F.: Die Waldkrankheiten. Berlin: P. Parey 1944. — [10] Pape, H.: Krankheiten und Schädlinge der Zierpflanzen. Berlin: P. Parey 1939. — [11] Nüsslin-Rhumbler: Forstinsektenkunde. Berlin: P. Parey 1927. — [12] Escherich, K.: Die Forstinsekten Mitteleuropas. Berlin: P. Parey 1931. — [13] Harms, J. W.: Zoobiologie. Jena: Gustav Fischer 1946. — [14] Kükenthal, W.: Zoologisches Praktikum. Jena: Gustav Fischer 1944. — [15] Kühn, A.: Grundriß der allgemeinen Zoologie. Leipzig: Georg Thieme 1944. — [16] Schlieper, C.: Praktikum der Zoophysiologie. Jena: Gustav Fischer 1940. — [17] Läuger, H. Martin u. P. Müller: Helvet. chim. Acta **27**, 892 (1944). — [18] Riemenschneider, R.: Pharm. **1**, Beih. 2 (Erg.-Bd.) (1947) (Schrifttum). — [19] Schönfeld, W.: Dtsch. med. Wschr. **1946**, 52. — [20] Velbinger, H. H.: Pharm. **2**, 268 (1947). — Dtsch. Gesdh.wes. **2**, 355 (1947). — [21] Baeyer, A. v.: Ber. dtsch. chem. Ges. **5**, 1194 (1872). — [22] Zeidler, O.: Ber. dtsch. chem. Ges. **7**, 1094 (1872). [23] Dauberschmidt, K.: Forstwiss. Zbl. **1944**, 64. — [24] Itzerott, H.: Kranke Pflanze **20**, H. 9 (1943). — [25] Zumpt, F.: Dtsch. Ärztebl. **74**, 25 (1944). — [26] Seel, H.: Dtsch. Ärztebl. **74**, 94 (1944). — [27] Friederichs, K.: Grundfragen und Gesetzmäßigkeiten der land- und forstwirtschaftlichen Zoologie. Berlin: P. Parey 1930. — [28] Escherich, K.: Leben und Forschen. Berlin: P. Parey 1944. [29] Seel, H.: Grundfragen der chemischen bzw. aviochemischen und der biologischen Schädlingsbekämpfung — Kampf dem Hunger. Stuttgart: Hippokrates-Verlag 1948. — [30] Krieg, H.: Z. angew. Chem. **40**, 201 (1927). — [31] Trappmann, W.: Chemische Pflanzenschutzmittel, S. 402ff., siehe Sorauer-Appels Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. VI, 2. Liefg. Berlin: P. Parey 1938. — [32] Escherich, K.: Dtsch. Forstwirt **14**, 707 (1932). — [33] Seel, H.: Forschungsbericht **1944** (unveröffentlicht). — [34] Gross, E., M. Bock u. F. Hellbung: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 271 (1942). — [35] Heubner, W.: Klin. Wschr. **1941**, 137; **1942**, 520, 961. [36] Tattersfield, F.: J. agricult. Sci. **17**, 181 (1927). Zit. nach Trappmann in Sorauer-Appel l. c. 31, S. 469. — [37] Möbius, K., u. E. Wedekind: Mitt. Forstwiss. **5**, 282 (1934). — [38] Oswald, A.: Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung. Berlin: Gebr. Borntträger 1924. — [39] Flury, F. u. Zernik: Schädliche Gase. Berlin: Springer 1931. — [40] Gibbs, W., u. E. Reichert: Ann. Physiol. Suppl. **1892**, 259. Zit. nach Oswald, 38. — [41] Lewin: Gifte und Vergiftungen. Berlin 1929. — [42] Schwarz, L.: Vergift.fälle **7**, 75 (1936). — [43] Koopmann: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **28** (1937). — [44] Nordmann, M. u. O. Weber: Arch. Gewerbepath. 8 (1938). — [45] Staub u. Mezeg: Arch. exper. Path. (D.) **178**, 52 (1935). — [46] Dodds: Zit. nach Staub u. Mezeg (45). — [47] De Chatel u. Motika: Dtsch. Arch. klin. Med. **176**, 700 (1934). — [48] Massermann and Goldschmidt: J. amer. med. Assoc. **102**, 523 (1934). Zit. nach Schwarz (42). — [49] Lehmann K. B., u. Schmidt-Kehl: Arch. Hyg. (D.) **96**, 363 (1926). — [50] Tscherkess u. Mitarb.: Arch. exper. Path. (D.) **179**, 13 (1935). — [51] Magne, Mayer et Plantefol: Ann. Physiol. (Fr.) 8, 1 (1932). Zit. nach L. Schwarz. — [52] Reichsarbeitsblatt **1941**, Nr 4. Merkblatt für Ärzte über Vergiftungen beim Arbeiten mit aromatischen Nitroverbindungen und Salpetersäuren. — [53] Gross: Klin. Wschr. **1942**, 877, 969. — [54] Walther, G.: Klin. Wschr. **1942**, 986. — [55] Heubner, W., u. M. Stuhlmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 1 (1942). — [56] Heubner, W.: Klin. Wschr. **1941**, 137; **1942**, 520, 961. — [57] Havemann, R., u. K. Wolff: Biochem. Z. **293**, 399 (1937). — Havemann, R., u. W. Heubner: Biochem. Z. **299**, 222 (1938).

[58] Jung, F.: Arch. exper. Path. (D.) **192**, 464 (1939). — Klin. Wschr. **1940**, 1016. [59] Issekutz, B. v. jr.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551 (1939). — [60] Gelinsky, G.: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 460 (1940). — [61] Kunz, G.: Arch. exper. Path. (D.) **199**, 508 (1942). — [62] Jung, F.: Klin. Wschr. **1940**, 1016. — [63] Jeney, A. v., u. T. Valyi-Nagy: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 423 (1939). — [64] Jeney, A. v., L. Ari u. P. Baranyai: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 407 (1939). — [65] Jeney, A. v., T. Valyi-Nagy, L. Vaczi u. St. Mihalik: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 718 (1940). — [66] Harangozo-Orossy, M. v., u. B. v. Issekutz jr.: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 146 (1942). — [67] Lardy, H. A., and P. H. Philipps: J. biol. Chem. (Am.) **149**, 177 (1943). — [68] Heymans, C., u. J. J. Boukart: Ndl. Tschr. Geneesk. **1932**, 3649. — [69] Cutting, W. C. Rytannek and M. L. Tainter: J. clin. Invest. (Am.) **13**, 547 (1943). — [70] Wichnofsky, Kane, Shlevin and Byron: Arch. int. Med. (Am.) **56**, 374 (1935). — [71] Jonnard, R.: J. Physiol. et Path. gen. **33**, 533 (1935). — [72] Boas, F.: Dynamische Botanik. München: J. F. Lehmann 1942. [73] Büchner, F.: Luftf.med. **6**, 281 (1942).

Dr. med. habil. Hans Seel, Berlin-Friedenau, Baumeisterstr. 1.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 655–665 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Die Sauerstoffbindung partiell oxydierten Blutfarbstoffs.

Von

Manfred Kiese und Georg Klingmüller.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Mai 1949.)

Der Blutfarbstoff höherer Tiere enthält in einer Molekel 4 Häme, ist also ein Tetra-Hämo-Globin. Durch Sauerstoff und verschiedene andere Oxydationsmittel kann das zweiwertige Eisen der Häme zu dreiwertigem oxydiert, also Hämiglobin (Methämoglobin) gebildet werden. Diese Reaktionen können je nach der Konzentration und Eigenschaft der Reaktionspartner mit verschiedenen Geschwindigkeiten und zu jedem Verhältnis Hämiglobin/Hämoglobin ablaufen. Für die Kinetik der Reaktion ergibt sich aus der Konstitution des Blutfarbstoffs als Tetra-Hämo-Globin die Frage, ob nach der Oxydation eines Häms in der Blutfarbstoffmolekel die restlichen drei eine wesentlich größere Wahrscheinlichkeit haben oxydiert zu werden, so daß im Grenzfalle nach Oxydation der Hälfte des Blutfarbstoffs die Hälfte der Molekeln Tetra-Hämi-Globin und die andere Hälfte Tetra-Hämo-Globin wäre; oder ob alle Häme immer die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, oxydiert zu werden, so daß in diesem Falle die weitaus meisten Molekeln Di-Hämo-Di-Hämi-Globin wären. Die Messung des Gleichgewichtes zwischen Sauerstoff und partiell oxydiertem Blutfarbstoff erwies sich als ein Weg, diese Frage zu untersuchen. Die Sättigung des Tetra-Hämoglobins mit Sauerstoff in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck entspricht nicht einem einfachen Massengleichgewicht, sondern ist eine Funktion, die durch die bekannte S-förmige „Sauerstoffbindungskurve" des Hämoglobins dargestellt ist.

Diese Funktion hat Adair[1] durch die Annahme von 4 verschiedenen Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion der 4 Häme der Hämoglobinmolekel mit Sauerstoff formal gedeutet und Pauling[2] durch die Annahme nur einer Gleichgewichtskonstanten und einer gegenseitigen Beeinflussung einzelner Häme (heme-heme-interaction), wodurch die Abhängigkeit der Änderung der freien Energie durch Bindung des Sauerstoffs von der Sättigung des Hämoglobins verständlicher wird.

[1] Adair, G. S.: Proc. Roy. Soc., Lond. A **109**, 292 (1925). — J. biol. Chem. (Am.) **63**, 529 (1925). — [2] Pauling, L.: Proc. nat. Acad. Sci. (Am.) **21**, 186 (1935).

Diese Häm-Häm-Beeinflussung äußert sich unter anderem dadurch, daß nach Bindung einer Molekel Sauerstoff an ein Häm für die anderen Häme der gleichen Molekel die Wahrscheinlichkeit zunimmt, ebenfalls mit Sauerstoff zu reagieren. Würden bei einer partiellen Oxydation einer Blutfarbstofflösung die einzelnen Molekeln partiell oxydiert, so müßte mit zunehmender Menge der Ferri-Häme der S-förmige Charakter der Sauerstoffbindungskurve der Ferro-Häme der Hämoglobinmolekeln immer mehr schwinden. Änderte die Oxydation des Eisens außerdem auch noch die Wirksamkeit eines Häms in der Häm-Häm-Beeinflussung, so sollte sich dadurch das Gleichgewicht zwischen Blutfarbstoff und Sauerstoff ändern. Beides ist tatsächlich der Fall.

Diese Änderung des Gleichgewichtes zwischen Sauerstoff und Hämoglobin durch die Hämiglobinbildung ist überdies von Interesse für das Verständnis der Auswirkungen einer partiellen Oxydation des Blutfarbstoffs auf den lebenden Organismus.

Eine Untersuchung von Hitzenberger[3] am Blute von Menschen mit familiärer Hämiglobinämie ergab bereits eine höhere Affinität dieses Blutes für Sauerstoff. Doch konnte dieser Befund noch nicht als eine Wirkung des Hämiglobins gedeutet werden. Nach Durchführung unserer Messungen wurden uns noch neuere Veröffentlichungen bekannt, in denen ebenfalls eine stärkere Sauerstoffaffinität hämiglobinhaltigen Blutes beschrieben wird (Derwiz und Meshcherina[4], Gibson und Harrison[5]), und vor allem Untersuchungen von Darling und Roughton[6], die den Einfluß des Hämiglobins auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins bereits genauer gemessen haben. Wir werden unten noch auf diese Arbeiten zurückkommen.

Methoden.

Alle Messungen wurden am Blutfarbstoff von Rindern durchgeführt und zwar sowohl am Blutfarbstoff innerhalb der roten Zellen wie vor allem an Blutfarbstofflösungen. Die roten Zellen wurden zunächst in der Zentrifuge mit isotoner Natriumchloridlösung gewaschen. In einem Teil der Zellen wurde durch Zusatz von Natriumnitrit bei 37° ein Teil des Hämoglobins zu Hämiglobin oxydiert. War der gewünschte Umsatz erreicht, so wurden die Zellen abermals auf der Zentrifuge 7mal gewaschen. Durch 30 mg Natriumnitrit je 10 g Hämoglobin wurde in etwa 35 min die Hälfte des Hämoglobins oxydiert und durch 40 mg je 10 g Hämoglobin in 50—60 min drei Viertel. Die Zellen wurden für die Messungen in der gleichen Menge eines Gemisches von 3 Teilen 0,9%iger

[3] Hitzenberger, K.: Wien. Arch. inn. Med. **23**, 85 (1932). — [4] Derwiz, G. V., u. G. N. Meshcherina: Farmakol. i. Toxikol. **9**, 32 (1946). Chem. Abstr. **41**, 3220 (1947). — [5] Gibson, Q. H., u. D. C. Harrison: Lancet **1947**, 941. — [6] Darling, R. C., u. F. J. W. Roughton: Amer. J. Physiol. **137**, 56 (1942).

Natriumchloridlösung und einem Teil isotoner Phosphatlösung suspendiert.

Konzentrierte Blutfarbstofflösungen wurden hergestellt durch Hämolyse von gewaschenen normalen bzw. mit Nitrit behandelten Zellen durch dreimaliges Frieren und Auftauen. Die Stromata der Zellen wurden danach durch Zentrifugieren abgetrennt und die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung durch Zusatz von Phosphat oder Phosphorsäure auf einen gewünschten Wert eingestellt.

Zur Messung des Gleichgewichtes von Zellsuspensionen und Lösungen mit Sauerstoff wurden diese in Mengen von 15 ml in Kolben von 500 ml Inhalt gegeben und im Wasserbad von 37° unter Schütteln mit durchgeleiteten Gemischen aus Sauerstoff und Stickstoff, die in großen Stahlflaschen vorbereitet waren und bei 37° mit Wasser gesättigt wurden, ins Gleichgewicht gebracht. Nach einer halben Stunde wurden Proben zur Analyse entnommen. Im einzelnen Versuch wurde jeweils ein Ansatz mit normalem Blutfarbstoff und ein anderer mit partiell oxydiertem Blutfarbstoff bei gleicher Wasserstoffionenkonzentration mit verschiedenen Sauerstoffdrucken ins Gleichgewicht gebracht. Die Messungen des Einflußes der Wasserstoffionen auf das Gleichgewicht wurden ausschließlich an Blutfarbstofflösungen, nicht an Zellsuspensionen durchgeführt.

Die aus den Messungen errechneten Sättigungsgrade des Blutfarbstoffs mit Sauerstoff beziehen sich auf die allein zur Sauerstoffbindung fähigen Ferro-Häme, nicht auf die gesamten Häme (Ferro-Häme + Ferri-Häme).

Die Konzentration des Hämiglobins wurde photometrisch nach der Methode von Evelyn und Malloy[7] sowie Havemann, Jung und v. Issekutz[8] bestimmt, Gesamtblutfarbstoff nach Oxydation mit Ferricyanid ebenfalls als Hämiglobin. Die Methode wurde durch Eisenbestimmungen mit Titantrichlorid nach Klumpp[9] standardisiert. Der Sauerstoffgehalt der Zellsuspensionen wurde manometrisch nach van Slyke und Neill[10] gemessen. Wasserstoffionen wurden potentiometrisch mit der Glaselektrode bestimmt.

Ergebnisse.

1. Der Hämiglobin-Effekt bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration.

Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß durch die partielle Oxydation des Blutfarbstoffs zu Hämiglobin sein maximales Sauerstoffbindungsvermögen um einen dem Hämiglobin entsprechenden Betrag

[7] Evelyn, K. A., u. H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1934). — [8] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz jr.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [9] Klumpp, T. G.: J. biol. Chem. (Am.) **107**, 213 (1934). — [10] Peters, J. P. u. D. D. van Slyke: Quantitative Clinical Chemistry. Baltimore 1931.

vermindert wird. Aber durch diese Veränderung des Blutfarbstoffs wird das Gleichgewicht der noch unveränderten Häme mit Sauerstoff, $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$, ebenfalls verändert. Die Ergebnisse unserer Messungen sind am kürzesten und anschaulichsten in „Sauerstoffbindungskurven" darzustellen, die den Grad der Sättigung des Hämoglobins in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck angeben. In Abb. 1 sind Messungsergebnisse an unverändertem Hämoglobin und solchem, das zu 50 bzw. 75% zu Hämiglobin oxydiert war, in Lösungen vom p_H 7,4 wiedergegeben. Durch die partielle Hämiglobinbildung wird die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins in den Bereich niederer Sauerstoffdrucke verschoben, und zwar um so mehr je größer der Anteil an Hämiglobin ist. Während Halbsättigung des unveränderten Hämoglobins bei 34 Torr Sauerstoff erreicht wird, ist Blutfarbstoff der zu 50 oder 75% zu Hämiglobin oxydiert ist, schon bei 20 Torr bzw. 12 Torr Sauerstoff zur Hälfte gesättigt. Durch das Hämiglobin wird nicht nur die Neigung der Gleichgewichtskurven verändert, sondern auch ihre Form. Die S-Form geht mit zunehmendem Hämiglobinanteil immer mehr verloren und bei 75% Hämiglobin hat sich die Kurve einer Hyperbel schon weitgehend genähert. Die genaue Messung gerade dieses Gleichgewichtes ist schwierig wegen der geringen Sauerstoffkapazität auch sehr konzentrierter Blutfarbstofflösungen (30 g/100 ml) und der hochgradigen Sättigung bereits bei sehr niedrigen Sauerstoffdrucken. Aber auch bei Berücksichtigung dieser Einschränkungen ist mit größter Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß eine rein hyperbolische Gleichgewichtskurve nicht erreicht wird.

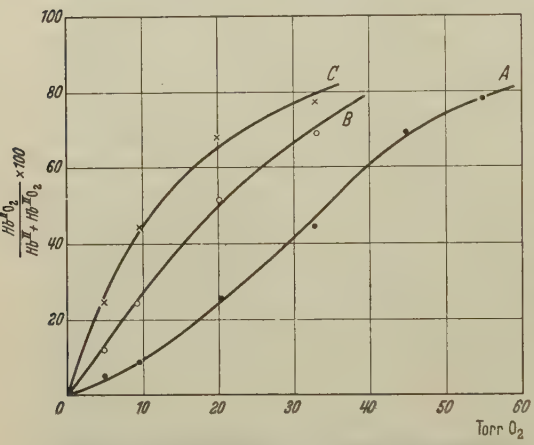


Abb. 1. Sauerstoffbindung von Rinderblutfarbstoff mit verschiedenen Anteilen Hämiglobin. Kurve A: Hämiglobin 2% des Gesamtblutfarbstoffs; Kurve B: Hämiglobin 54% des Gesamtblutfarbstoffs; Kurve C: Hämiglobin 79% des Gesamtblutfarbstoffs. Gesamtblutfarbstoffkonzentration 25g/100 ml, p_H 7,4, Temperatur 37° C.

Messungen an Zellsuspensionen ergaben eine ganz entsprechende Wirkung des Hämiglobins und brauchen darum nicht wiedergegeben zu werden.

2. Der Einfluß der Wasserstoffionen auf den Hämiglobin-Effekt.

Wasserstoffionen beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Hämoglobin und Sauerstoff in dem Sinne, daß der zur Halbsättigung des

Hämoglobins erforderliche Sauerstoffdruck mit der Wasserstoffionenkonzentration bis zu einen p_H zwischen 6,5 und 6,0 zunimmt. Durch die partielle Hämiglobinbildung wird diese Wirkung der Wasserstoffionen nicht aufgehoben. In Abb. 2 ist die Sauerstoffsättigung von Hämoglobin und Blutfarbstoff, der zu 75% zu Hämiglobin oxydiert ist, in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck bei p_H 7,4 und p_H 6,2 wiedergegeben. Die Halbsättigungsdrucke werden bei beiden Proteinen durch die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration erhöht. Die Wirkung der Wasserstoffionen auf beide Proteine ist jedoch nicht gleich stark. Mit Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration von p_H 7,4 auf p_H 6,2 nimmt der Halbsättigungsdruck des Blutfarbstoffs mit 75% Hämiglobin von 12,5 auf 27,5 Torr, also auf den 2,2fachen Wert zu, der Halbsättigungsdruck des Hämoglobins von 34 auf 57 Torr, also den 1,7fachen Wert.

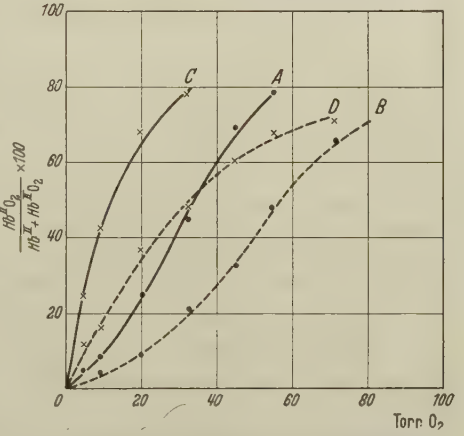


Abb. 2. Sauerstoffbindung von Hämoglobin und Blutfarbstoff, der zu 75% Hämiglobin oxydiert ist bei p_H 7,4 und 6,2. Kurve A: Hämoglobin p_H 7,4; Kurve B: Hämoglobin p_H 6,2; Kurve C: Blutfarbstoff mit 79% Hämiglobin p_H 7,4; Kurve D: Blutfarbstoff mit 76% Hämiglobin p_H 6,2. Gesamtblutfarbstoffkonzentration 25—29 g/100ml, Temperatur 37,0° C.

Aus einer Reihe von Messungen der Sauerstoffsättigung bei Wasserstoffionenkonzentrationen zwischen p_H 5 und 9, haben wir die Halbsättigungsdrucke bei den betreffenden Wasserstoffionenkonzentration interpoliert. Messungen bei nahe zusammenliegenden Wasserstoffionenkonzentrationen wurden zu Gruppen zusammengefaßt, z. B. p_H 5,1—5,2, 5,7—5,8 usw. Ebenso wurden die Blutfarbstofflösungen nach ihren Hämiglobinanteil gruppiert in solche mit weniger als 15% Hämiglobin, die als „reine Hämoglobinlösungen" betrachtet wurden, solche mit 40—60% Hämiglobin, die in der Gruppe „50% Hämiglobin" zusammengefaßt wurden, und schließlich solche mit mehr als 60% Hämiglobin, die die Gruppe „75% Hämiglobin" ausmachen. Die Mittel dieser Gruppen sind in der Abb. 3 verwertet, die die Abhängigkeit der Halbsättigungsdrucke der drei verschiedenen Blutfarbstofflösungen vom p_H angibt. Für alle 3 Blutfarbstoffe steigt der Halbsättigungsdruck mit Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration von p_H 8,5 bis 6,5 stark an, erreicht in der Nähe von p_H 6 ein Maximum und fällt mit weiterer Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration wieder ab. Bei Wasserstoffionenkonzentrationen über p_H 5,5 haben wir die Sauerstoffbindung

„reiner Hämoglobinlösungen" nicht mehr einwandfrei messen können, da in den sauren Lösungen bei den niederen Sauerstoffdrucken immer mehr als 15% des Blutfarbstoffs durch Sauerstoff zu Hämiglobin oxydiert wurden. Nach den Messungsergebnissen zwischen p_H 6,5 und 5,5 ist es jedoch wahrscheinlich, daß sich die Halbsättigungsdrucke in ähnlicher Weise wie die der anderen beiden Blutfarbstofflösungen mit dem p_H ändern. In Blutfarbstofflösungen mit 50 bzw. 75% Hämiglobin sinkt der Halbsättigungsdruck mit Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration über p_H 5,5 weiter ab.

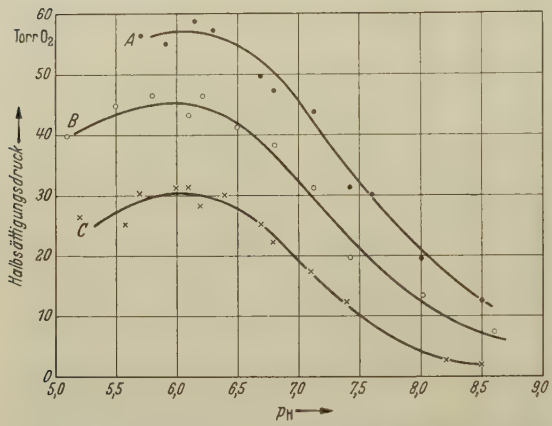


Abb. 3. Abhängigkeit der Halbsättigungsdrucke von Hämoglobin (Kurve A), Blutfarbstoff mit 50% Hämiglobin (Kurve B) und Blutfarbstoff mit 75% Hämiglobin (Kurve C) von der Wasserstoffionenkonzentration. Gesamtblutfarbstoffkonzentration 24—30g/100 ml, Temperatur 37,0° C.

Die in Abb. 3 gezeichneten Kurven laufen annähernd parallel. Daraus ergibt sich, daß der Einfluß der Wasserstoffionen auf die verschiedenen Formen des Blutfarbstoffs nicht gleich ist. Wenn wir den Halbsättigungsdruck als Maß für die Affinität zwischen Hämoglobin und Sauerstoff wählen, so ist dieser für „reine Hämoglobinlösungen" bei p_H 6,1 nur 4,5mal so hoch wie bei p_H 8,5, für Lösungen mit 50% Hämiglobin aber 7mal so hoch und für Lösungen mit 75% Hämiglobin etwa 15mal so hoch.

Besprechung.

Unsere Messungen der Sauerstoffbindung von Blutfarbstofflösungen vom p_H 7,4 stimmen gut überein mit den Ergebnissen von DARLING und ROUGHTON[6] an Lösungen von Rinderblutfarbstoff mit gleichem p_H. Über den Einfluß der Wasserstoffionen geben die Autoren lediglich an, daß bei p_H 6,8 die gleiche relative Verlagerung der Sauerstoffbindungskurven beobachtet wurde wie bei p_H 7,4.

Auf die Frage, ob bei einer partiellen Oxydation von Hämoglobin ein Teil der Tetra-Hämo-Globinmolekeln in Tetra-Hämi-Globin-Molekeln verwandelt wird und der Rest als Tetra-Hämo-Globin-Molekeln bestehen bleibt oder je nach dem Grade der Oxydation Tri-Hämo-Hämi-Globin-, Di-Hämo-Di-Hämi-Globin- bzw. Hämo-Tri-Hämi-Globin-Molekeln gebildet werden, geben unsere Messungsergebnisse eine

eindeutige Antwort in dem Sinne, daß bei partieller Oxydation einer Hämoglobinlösung partiell oxydierte Molekeln, also Tri-Hämo-Hämi-Globin usw., gebildet werden.

Für das Auftreten partiell oxydierter Blutfarbstoffmolekeln sprachen schon die kinetischen Untersuchungen vom Brooks[11], nach denen die Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin durch Sauerstoff bei konstantem Sauerstoffdruck nach der Änderung der Hämoglobinkonzentration als Reaktion erster Ordnung verläuft. Alle freien Häme müßten dann die gleiche Wahrscheinlichkeit haben oxydiert zu werden, und somit auch Tri-Hämo-Hämi-Globin-, Di-Hämo-Di-Hämi-Globin und Hämo-Tri-Hämi-Globin-Molekeln auftreten. Allerdings erscheinen Brooks[11] Annahmen nach unseren Ergebnissen nicht ganz zutreffend, denn in seine Gleichung für die Oxydationsgeschwindigkeit $\frac{dx}{dt} = K' m (a - x) \frac{P}{1 + bp}$ (K' und b sind Konstanten, m der Anteil des freien Hämoglobins beim Sauerstoffdruck p und $(a—x)$ der Anteil noch nicht oxydierten Hämoglobins) geht m, der Anteil des freien Hämoglobins, als eine nur vom Sauerstoffdruck sowie Temperatur und Wasserstoffionenkonzentration abhängige Größe ein, während sie sich in Wirklichkeit mit Zunahme des Hämiglobins erheblich ändert. Der Anteil an freiem Hämoglobin wird nämlich kleiner. Wenn trotzdem der Umsatz weiterhin dieser Gleichung folgt, so bedeutet das, daß partiell oxydierte Molekeln eine größere Wahrscheinlichkeit haben ein weiteres Elektron von einem Eisen abzugeben.

Die Verlagerung und Verformung der Sauerstoffbindungskurve der nicht oxydierten Häme wird nur verständlich durch die Annahme partiell oxydierter Molekeln. Zwar ist das Gleichgewicht zwischen Hämoglobin und Sauerstoff auch von der Hämoglobinkonzentration abhängig[12] und die Oxydation eines Teiles der Hämoglobinmolekel bedeutet eine Verdünnung der Hämoglobinlösungen, doch ist dieser Verdünnungseffekt zu gering um die beobachtete Wirkung der partiellen Hämiglobinbildung auf die Sauerstoffbindung zu erklären. Die Wirkung der Oxydation einzelner Häme auf die Sauerstoffbindung ist gleichsinnig der einer Bindung von Sauerstoff oder Kohlenoxyd an die betreffenden Häme: Die Affinität der noch unveränderten Häme für Sauerstoff wird erhöht. Doch ist die Wirkung der Oxydation eines Hämes geringer als die seiner Bindung an Kohlenoxyd. J. B. S. Haldane[13] hat aus den Messungen von Douglas, Haldane und Haldane[14] an Menschenblut bei einem p_H von etwa 7,3—7,4 die Wirkung der Kohlenoxydbindung auf die Sauerstoffbindung der noch freien Häme des Hämoglobins berechnet und gefunden, daß bei Besetzung der Hälfte der Häme mit Kohlenoxyd der Druck für Halbsättigung der übrigen Häme mit Sauerstoff unter die Hälfte des Druckes absinkt, der zur Halbsättigung kohlenoxydfreien Blutes erforderlich ist. Demgegenüber

[11] Brooks, J.: Proc. roy. Soc., Lond. B **109**, 35 (1931); **118**, 560 (1935). — J. Physiol. (Brit.) **107**, 332 (1948). — [12] Boeri, E., u. A. Vescia: Arch. internat. Physiol. **55**, 153 (1947). — [13] Haldane, J. B. S.: J. Physiol. (Brit.) **45** XXII (1912). — [14] Douglas, C. G., J. S. Haldane u. J. B. S. Haldane: J. Physiol. (Brit.) **44** 275 (1912).

wird durch Oxydation der Hälfte der Häme der Druck für die Halbsättigung der restlichen mit Sauerstoff nur um etwa ein Drittel vermindert (Abb. 1). Mit dieser Feststellung stimmen Messungen von DARLING und ROUGHTON[6] überein, durch die gezeigt wurde, daß in Blutfarbstofflösungen mit 56% Hämiglobin der Halbsättigungsdruck für die Sauerstoffsättigung der Ferro-Häme etwa gleich stark erniedrigt ist wie in Blutfarbstofflösungen, in denen 32% der Häme an Kohlenoxyd gebunden sind.

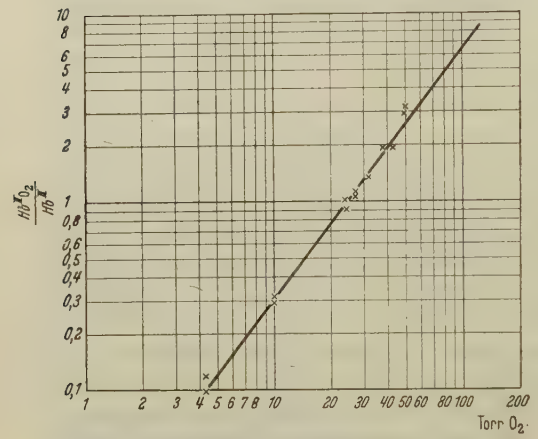


Abb. 4. Ermittlung des Sigmoidexponenten der Sauerstoffbindungskurve von Blutfarbstoff, der zu 76% zu Hämiglobin oxydiert ist, aus der Neigung der Geraden $\log \frac{Hb^{II}O_2}{Hb^{II}}$ gegen $\log P_{O_2}$. Blutfarbstoff vom Rinde bei pH 6,7 und 37,0° C.

Obwohl die Existenz partiell oxydierter Blutfarbstoffmolekeln sicher anzunehmen ist, verhält sich Blutfarbstoff, von dem 75% der Ferro-Häme zu Ferri-Hämen oxydiert sind, gegenüber Sauerstoff nicht so wie man es von Molekeln, die nur ein Häm haben, wie die des Muskelhämoglobins, erwarten sollte. Während die Sauerstoffbindung des Muskelhämoglobins[15] der Gleichung $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$ folgt, ist das beim Blutfarbstoff, der zu 75% zu Hämiglobin oxydiert ist, nicht der Fall. Vielmehr hat die Sauerstoffbindungskurve dieses Blutfarbstoffs noch einen Sigmoidexponenten[16], der dem n in HILLS[17] Gleichung für das Gleichgewicht zwischen Sauerstoff und Tetra-Hämoglobin entspricht $y = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}$ (y = Anteil der an Sauerstoff gebundenen Häme, p = Sauerstoffdruck), und folgt einer Gleichung $Hb_n + n\ O_2 = Hb_n\ (O_2)_n$. Während für das Gleichgewicht zwischen Sauerstoff und Tetra-Hämo-Globin $n = 2{,}6$ beträgt, ist n für das Gleichgewicht zwischen Sauerstoff und Blutfarbstoff, der zu 75% zu Hämiglobin oxydiert ist, nur wenig verschieden von 1, nämlich nach Abb. 4 etwa $n = 1{,}3$. Es müssen also noch Molekeln vorhanden sein, an denen eine mit der Sauerstoffsättigung variable Häm-Häm-Beeinflussung der Sauerstoffbindung möglich ist, d. h. solche mit mindestens zwei Ferro-Hämen. Nehmen wir an, daß die Häm-Häm-Beeinflussungsenergie zweier Ferro-Häme für die Sauerstoffbindung durch die Anwesenheit zweier Ferri-Häme in der Molekel nicht verändert ist, so dürfte in einer Blutfarbstofflösung, die zu 75%

[15] THEORELL, H.: Biochem. Z. **268**, 73 (1934). — [16] CORYELL, C. D.: J. physic. Chem. **43**, 841 (1939). — [17] HILL, A. V.: Biochem. J. (Brit.) **7**, 471 (1931).

oxydiert ist, der Anteil der Molekeln mit mehr als einem Ferro-Häm von der Größenordnung 5% sein und ein entsprechender Anteil als Tetrahämiglobin vorliegen.

Auf eine derartige Verteilung der Ferro-Häme und Ferri-Häme weisen auch die Messungen des Oxydations-Reduktionspotentials des Systems Hämiglobin-Hämoglobin hin. Nach diesem besteht auch für Abgabe von Elektronen vom Hämoglobin, $Hb^{II} \rightleftharpoons Hb^{III} + e^-$ eine Häm-Häm-Beeinflussung. CORYELL[16] errechnete aus Messungen von CONANT und Mitarbeitern [18–21] und HAVEMANN und WOLFF[22] für das Elektrodenpotential einen mittleren Sigmoidkoeffizienten von $n = 1{,}6$. Auch aus den Messungen von TAYLOR und HASTINGS[23] ergibt sich $n > 1$. Nach neueren Messungen von HAVEMANN[24] beträgt $n = 1{,}12$. Diesen Werten ist der Sigmoidexponent der Sauerstoffbindung von Blutfarbstoff mit 75% Hämiglobin ähnlich, und es ist sehr wahrscheinlich, daß er durch die Häm-Häm-Beeinflussung auf die Elektronenabgabe des Hämoglobins bedingt wird. Da die Häm-Häm-Beeinflussungsenergie eines Oxy-Ferro-Häms auf die Reaktion $Hb^{II} + O_2 \rightarrow Hb^{II}O_2$ und eines Ferri-Häms auf die Reaktion $Hb^{II} \rightarrow Hb^{III} + e^-$ sehr verschieden ist, nämlich 1500 cal/Äquivalent für jene und 600 cal/Äquivalent für diese, ist die Errechnung der Beeinflussungsenergie eines Ferri-Häms auf die Reaktion $Hb^{II} + O_2 \rightarrow Hb^{II}\,O_2$ kompliziert, und unsere Daten reichen für genauere Angaben noch nicht aus. Die Energie ist < 1500 cal/Äquivalent, wahrscheinlich etwa 1000 cal. Wir werden in einer späteren Untersuchung diese Größe noch ausführlicher behandeln.

BOERI und VESCIA[25] ziehen aus einer Untersuchung der Daten von DARLING und ROUGHTON[6] den Schluß, daß in einer partiell oxydierten Blutfarbstofflösung nur Tetra-Hämo-Globin- und Tetra-Hämi-Globinmolekeln vorhanden wären. Dann müßten die Gleichgewichtskurven solcher Lösungen mit Sauerstoff den gleichen Sigmoidexponenten haben wir die reiner Tetra-Hämo-Globinlösungen, nämlich $n = 2{,}6$. Nach unseren Messungen beträgt für Lösungen mit 75% Hämiglobin jedoch $n = 1{,}3$, und aus den Kurven von DARLING und ROUGHTON[6] ergeben sich Werte von $n = 1{,}4$—$1{,}5$.

Über den Einfluß der Wasserstoffionen auf die Sauerstoffbindung des Blutfarbstoffs sei zunächst bemerkt, daß unsere Messungen an „reinen Hämoglobinlösungen" die Ergebnisse von RONA und YLPPÖ[26]

[18] CONANT, J. B.: J. biol. Chem. (Am.) **57**, 401 (1923). — [19] CONANT, J. B., u. A. M. PAPPENHAEIMER: J. biol. Chem. (Am.) **98**, 57 (1932). — [20] CONANT, J. B., u. L. S. FIESER: J. biol. Chem. (Am.) **62**, 595 (1925). — [21] CONANT, J. B., u. N. D. SCOTT: J. biol. Chem. (Am.) **79**, 207 (1928). — [22] HAVEMANN, R., u. K. WOLFF: Biochem. Z. **293**, 399 (1937). — [23] TAYLOR, J. F., u. A. B. HASTINGS: J. biol. Chem. (Am.) **131**, 649 (1939). — [24] HAVEMANN, R.: Biochem. Z. **314**, 118 (1943). — [25] BOERI, E., u. A. VESCIA: Experientia **3**, 155 (1947). — [26] RONA, P., u. A. YLPPÖ: Biochem. Z. **76**, 187 (1916).

und Ferry und Green[27] insofern bestätigen, als der Halbsättigungsdruck des Sauerstoffs zwischen p_H 6,0 und 6,5 ein Maximum erreicht und mit weiterer Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration wieder abnimmt. Im übrigen sind die Messungsergebnisse nicht vergleichbar, da Ferry und Green bei 20° gemessen haben und wir bei 37° C. Für $p_H < 5{,}7$ können wir gemessene Halbsättigungsdrucke nicht angeben, da in saueren Lösungen während der Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Sauerstoff und Hämoglobin zuviel Hämiglobin gebildet wird.

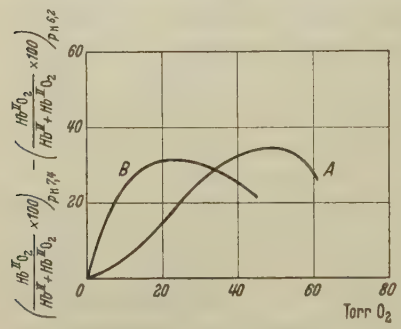


Abb. 5. Differenz der Sauerstoffsättigung bei pH 7,4 und pH 6,2,

$$\left(\frac{Hb^{II}O_2}{Hb^{II}+Hb^{II}O_2}\cdot 100\right)_{pH\ 7{,}4} - \left(\frac{HbII_{O_2}}{Hb^{II}+Hb^{II}O_2}\cdot 100\right)_{pH\ 6{,}2},$$

von Hämoglobin (Kurve A) und Blutfarbstoff, der zu 76—79% zu Hämiglobin oxydiert ist (Kurve B) in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck.

Durch die Hämiglobinbildung werden die Halbsättigungsdrucke erniedrigt und entsprechen daher nicht mehr denen reiner Hämoglobinlösungen. Ferry und Green[27] hatten die Bildung größerer Mengen „inaktiven Hömoglobins" in saueren Lösungen bereits beobachtet, konnten jedoch dessen Einfluß auf die Sauerstoffbindung des „aktiven Hämoglobins" noch nicht beurteilen.

Nach unseren Messungen erscheint der Einfluß der Wasserstoffionen auf die Sauerstoffbindung von Blutfarbstofflösungen mit 75% Hämiglobin stärker als auf die von „reinen Hämoglobinlösungen". Ob die Ionisierung des Eisens des Hämiglobins (pK = 8,2) diesen Unterschied erklären kann, ist noch nicht zu entscheiden. Die Zunahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins in Lösung mit Wasserstoffionenkonzentrationen über p_H 6 steht wahrscheinlich mit der Ladung des zweiten Imidazol-Stickstoffs im Histidin in Zusammenhang. Während nämlich die freie Energie der Wasserstoffionenbindung der ersten Imidazolgruppe (pK = 7,81) durch Sauerstoffbindung an das zugeordnete Häm zunimmt (pK = 6,80) nimmt die freie Energie der zweiten Imidazolgruppe (pK = 5,25) durch Sauerstoffbindung ab (pK = 5,72) (Wyman[28, 29]).

Einer kurzen Erörterung bedarf noch die Bedeutung der partiellen Hämiglobinbildung für die Atmungsfunktion des Blutes. Es ist aus der Abb. 1 leicht zu erkennen, daß durch die Hämiglobinbildung auch die Atmungsfunktion der restlichen Ferro-Häme beeinträchtigt wird. Bei niedrigen Sauerstoffdrucken zerfällt die Sauerstoffverbindung der Ferro-Häme schwieriger, wenn gleichzeitig Ferri-Häme vorhanden sind; der

[27] Ferry, R. M., u. A. A. Green: J. biol. Chem. (Am.) **81**, 175 (1929). — [28] German, B., u. J. Wyman: J. biol. Chem. (Am.) **117**, 533 (1937). — [29] Wyman, J.: J. biol. Chem. (Am.) **127**, 581 (1939).

an den Blutfarbstoff gebundene Sauerstoff ist den Geweben schwieriger verfügbar. Dadurch wird die Sauerstoffversorgung der Gewebe noch über die Verminderung der Sauerstoffkapazität des Blutes hinaus verschlechtert in ähnlicher Weise wie es durch Besetzung eines Teiles des Hämoglobins mit Kohlenoxyd der Fall ist. Diese Wirkung der Ferri-Häme wird im Atmungszyklus des Blutfarbstoffs jedoch durch die Wasserstoffionen gehemmt. Am Blutfarbstoff mit Ferri-Hämen ist nämlich die Wirkung der Wasserstoffionen auf den Sättigungsgrad der Ferro-Häme mit Sauerstoff gerade bei niedrigen Sauerstoffdrucken sehr stark, wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, und wesentlich stärker als am Tetra-Hämo-Globin. Das ist noch anschaulicher, wenn aus den Daten der Abb. 2 die Differenz der Sauerstoffsättigung zwischen p_H 6,2 und p_H 7,4 in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck für die beiden Blutfarbstoffe dargestellt wird (Abb. 5). Wenn Tiere nach Oxydation von 70% ihres Blutfarbstoffs zu Hämiglobin trotz Hämiglobineffekt auf die Sauerstoffbindung des restlichen Hämoglobins stundenlang leben können, so ist das sicher zum guten Teil dem günstigen Einfluß der Wasserstoffionen auf den Hämiglobineffekt zuzuschreiben.

Zusammenfassung.

Durch partielle Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin wird die Sauerstoffbindung der noch vorhandenen Ferro-Häme in zweifacher Weise verändert. Erstens wird der Sigmoidcharakter der Sauerstoffbindungskurve mit wachsendem Anteil der Ferri-Häme schwächer; für Blutfarbstofflösungen, in denen 75% der Häme oxydiert sind, ist der Sigmoidexponent der Sauerstoffbindung nur mehr $n = 1{,}3$. Zweitens nimmt die Affinität zwischen den restlichen Ferro-Hämen und Sauerstoff zu. Daraus wird geschlossen, daß bei der Oxydation des Blutfarbstoffs (Tetra-Hämo-Globin) partiell oxydierte Molekeln, also Hämi-Tri-Hämo-Globin, Di-Hämi-Di-Hämo-Globin und Tri-Hämi-Hämo-Globin, auftreten, und daß die Oxydation eines Häms im Tetra-Hämoglobin auf die Sauerstoffbindung der anderen Häme eine ähnliche Wirkung hat wie seine Bindung an Sauerstoff oder Kohlenoxyd.

Wasserstoffionen hemmen die Sauerstoffbindung des Di-Hämi-Di-Hämo-Globins und Tri-Hämi-Hämo-Globins stärker als die des Tetra-Hämo-Globins. Die Wirkung der Wasserstoffionen nimmt mit ihrer Konzentration bis p_H 6 zu und darüber wieder ab.

Durch den Hämiglobineffekt auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins wird die Atmungsfunktion des Blutfarbstoffs noch über den Verlust an Sauerstoffkapazität hinaus beeinträchtigt. Durch die Wirkung der Wasserstoffionen im Atmungszyklus des Blutfarbstoffs werden die physiologisch nachteiligen Auswirkungen des Hämiglobineffektes jedoch eingeschränkt.

Prof. Dr. Manfred Kiese, Kiel, Feldstr. 12.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 666—687 (1949).

Aus der Universitäts-Kinderklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. H. Kleinschmidt).

Die neurovegetative Lenkung des Eisenstoffwechsels*.

Von
Karl-Heinz Schäfer und Ilse Boenecke.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Juni 1949.)

In der langen Geschichte der Eisenstoffwechselforschung hat es immer wieder Zeiten besonderer Aktivität gegeben, welche — meist unter dem Einfluß neuer Untersuchungsmethoden — in besonderem Grade die Voraussetzungen dafür schafften, die Grenzen unseres Wissens um das Eisenstoffwechselgeschehen zu erweitern. Eine solche Periode fruchtbaren Schaffens auf dem Gebiete der Eisenstoffwechselforschung hält seit 10—15 Jahren unvermindert an. Sie bediente sich vor allem der Serumeisenmessung und neuerdings auch des künstlich radioaktiv gemachten Eisens als Stoffwechseltest und brachte auf diesen Wegen eine Fülle von Entdeckungen, die in extenso aufzuführen hier nicht der Ort ist. Um so bemerkenswerter erscheint es, daß Versuche, ein *übergeordnetes Regulationsprinzip* für die hier gemeinten Vorgänge zu konstruieren und experimentell zu beweisen bisher praktisch fehlen. Für die Schließung dieser Lücke einen Beitrag zu liefern, soll die Aufgabe der nun folgenden Ausführungen sein.

Es ist eine alte Erkenntnis, daß das Eisen zu den unbedingt lebensnotwendigen Elementen der Organismen höherer Tiere gehört, und fast ebensolange weiß man, daß von den 4—5 g Eisen, die beispielsweise der gesunde erwachsene Mensch in seinem Körper besitzt, mehr als die Hälfte im Hämoglobin in der bekannten Weise strukturell und funktionell verankert ist. Diese unverhältnismäßig große Hämoglobineisenquote hat in früheren Untersuchungen die beherrschende Rolle gespielt. Sie tritt erst in den Publikationen der letzten 10—20 Jahre mehr und mehr zurück, weil man ihre Bedeutung und ihren inneren Kreislauf einigermaßen zu kennen glaubt. So weiß man, daß der Erythroblast im Knochenmark das Eisen für die Hämoglobinsynthese benötigt, daß das Hämoglobin dann im reifen Erythrozyten mit dem Blutstrom kreist, um schließlich in den Retikuloendothelien (RE) nach Abspaltung des Eiweißträgers über mehr oder weniger hypothetische Zwischenstufen in Bilirubin und Eisen zu verfallen. Die verbindende Brücke zwischen dem Eisen benötigenden Erythroblasten im Knochenmark und dem eisenfreimachenden RE irgendwo im Körper bildet das *Plasma-* bzw. *Serumeisen*, wie man seit den grundlegenden Untersuchungen von Heilmeyer und

* Herrn Prof. Dr. J. Schüller zu seinem 60. Geburtstage (21. 2. 48) gewidmet. — Auszugsweise in der Medizinischen Gesellschaft Göttingen am 26. Februar 1948 vorgetragen.

Plötner u. a. weiß. Es stellt *die* Transportform des Eisens im Körper dar und hat als solches natürlich nicht nur dem erwähnten intermediären Hämoglobineisenumsatz zu dienen, sondern es hat auch die Verbindung mit dem resorbierenden und vielleicht auch ausscheidenden Magen-Darmtrakt herzustellen und nicht zuletzt den gesamten übrigen Eisenbedarf des Organismus zu befriedigen. Jede einzelne Körperzelle benötigt bekanntlich Spuren von Eisen zum Ablauf elementarster Lebensvorgänge, wobei in diesem Zusammenhang nur an die eisenhaltigen Wirkstoffe Zytochrom, Warburgsches Atemferment, Peroxydase, Katalase, an das Myoglobin und andere Gewebeeisenfraktionen erinnert sei, die man gemeinhin als *Funktionseisen* zusammenfaßt und dem weniger stoffwechselaktiven *Depoteisen* gegenüberstellt. Letzteres findet sich vornehmlich in Milz, Leber und Knochenmark, und es ist wohl kein Zufall, daß es sich hierbei gerade um die an RE besonders reichen Organe handelt. Es hat sich nämlich in vielen Untersuchungen herausgestellt, daß die RE einen ganz wesentlichen Einfluß auf den Eisenstoffwechsel zu nehmen vermögen. Sie können nicht nur, wie oben schon erwähnt, Eisen aus dem Hämoglobin freimachen und speichern, sondern, wenn sie beispielsweise durch einen Infekt, durch ein allergisches Geschehen, durch aseptisches Fieber oder sonstwie gereizt sind, beträchtliche Eisenmengen aufnehmen und auf diese Weise der Hämoglobinsynthese streitig machen.

Das *Serumeisen* stellt einen außerordentlich fein reagierenden Indikator für das gegenseitige Verhältnis von Eisenangebot und -nachfrage dar. Seine *Erhöhung* kann vermehrter Eisenresorption, verstärktem Blutzerfall oder auch vermehrter Freigabe von Eisen aus den RE, seine *Erniedrigung* den entgegengesetzten Vorgängen entspringen. Mit Hilfe von Serumeisenmessungen können wir am einfachsten die feinen Nuancen im Eisenstoffwechselgeschehen erfassen, auf die es in der hier zur Erörterung stehenden Fragestellung ankommen muß. Eine andere Möglichkeit wären Gewebeeisenbestimmungen im Rahmen bestimmter Versuchsanordnungen. Sie sind aber für unsere Versuchsbedingungen viel zu träge in den Ausschlägen ihrer Ergebnisse und entbehren überdies der Möglichkeit einer fortlaufenden Anwendung am gleichen Versuchsobjekt. *Wir glauben daher, mit Hilfe von fortlaufenden Serumeisenbestimmungen am ehesten einen Einblick in den Eisenhaushalt und vielleicht auch in die Regulationsmechanismen dieser Stoffwechselquote gewinnen zu können.*

Die Höhe des Serumeisens als Spiegel der Gesamteisenstoffwechsellage und letzlich auch der Eisenstoffwechselregulation wird nach der bislang herrschenden Auffassung im wesentlichen durch das Verhältnis von Angebot zu Nachfrage bestimmt. Irgendein höher gelegenes, ordnendes Stoffwechselprinzip wird in diesem Zusammenhang kaum ernstlich diskutiert. Daß aber dennoch ein solches vorhanden sein dürfte, sagen uns eine Reihe bekannter Tatsachen aus dem Gebiete des Eisenstoffwechsels. Einige von ihnen seien im folgenden aufgeführt:

1. Was veranlaßt im Infekt die Darmepithelien, vermehrt Eisen zu resorbieren, um den verstärkten Eisenhunger der weitabliegenden RE zu befriedigen? (Schäfer.)

2. Wie kommt es andererseits, daß die Darmepithelien bei stärkerer Eisenfütterung nach kurzer Zeit kein weiteres Eisen mehr resorbieren? (Fintzel, Heilmeyer und Moch.) Die im amerikanischen Schrifttum, z. B. von Hahn, Bale und Whipple und von Gillman und Jvy vertretene Auffassung, daß ein Protein der Darmepithelien („Apoferritin") als „muscosal acceptor" für Eisen und nach Sättigung als „muscosal block" für dieses Metall wirkt, vermag unseres Erachtens diese Frage nur teilweise zu beantworten. Wie kommt es nämlich, daß bei Übersättigung des Körpers mit Eisen dieses Metall als der erwähnte „muscosal block" in den Darmepithelien liegenbleibt, während es sich im Eisenmangelzustand, z. B. nach größeren Blutverlusten, schnell im Körper verteilt? Offenbar spielt das Niveau des Serumeisenspiegels in diesem Geschehen eine wichtige Mittlerrolle, indem seine Erhöhung den Abtransport des Eisens aus der Darmwand hemmt, während seine Erniedrigung den gleichen Vorgang fördert. Damit kommen wir auf die letzte, problematischste der in diesem Zusammenhang zu diskutierenden Tatsachen.

3. Die ziemlich konstante Einstellung des Serumeisenspiegels auf rund 90—120 γ-% in gesunden Tagen. Warum liegt dieses Niveau nicht wesentlich höher oder tiefer? Beides wäre mit einer ausgeglichenen Bilanz von Angebot und Nachfrage im Eisenhaushalt zu vereinen. Gewiß muß man sich in diesem Zusammenhang die Frage vorlegen, ob die Höhe des Serumeisens nicht einfach aus dem Gehalt des Serums an jenen bestimmten Globulinen resultiert, welche als die fast ausschließlichen Serumeisenträger anzusprechen sind. Da diese Globulinfraktion aber nur 3% der Serumproteine ausmacht, und da ein solches Globulinmolekül nur 2 Eisenatome zu binden vermag, wäre eine gewisse Begrenzung des Eisenspiegels nach oben hierdurch bereits gegeben. Tatsächlich gelingt es durch noch so hohe perorale Eisengaben nicht, das Serumeisen wesentlich über den Wert von 400 γ-% zu treiben. Aber damit wäre noch nicht das Einspielen des Serumeisens auf das offenbar optimale Niveau von rund 90—120 γ-% erklärt.

Die aus diesen und anderen Gegebenheiten sich uns aufdrängende Arbeitshypothese war die, daß womöglich auch der Eisenstoffwechsel einer zentralnervösen Lenkung unterliegt. Diese Hypothese lag nahe, nachdem bereits für die verschiedensten Teilgebiete des stoffwechselchemischen und zellbiologischen Geschehens eine centralnervös gelenkte und auf den Bahnen des vegetativen Nervensystems geleitete Steuerung nachgewiesen worden war. Es sei in diesem Zusammenhang nur an den Zucker-, Fett-, Lipoid- und Mineralstoffwechsel, Kalium-Kalziumgleichgewicht, an den Wärme- und Wasserhaushalt, an die Puls- und Blutdruckverhältnisse und schließlich an den Haushalt der weißen und roten Blutzellen erinnert. Für den Eisenstoffwechsel liegt in dem uns zugänglichen

Schrifttum nur eine Studie von Wetzel (1943) vor. Sie wird im folgenden noch mehrfach Erwähnung finden. Auch Vahlquist deutet in seiner umfassenden Monographie über das Serumeisen (1941) mit wenigen Sätzen die Möglichkeit einer „Einwirkung hormonaler oder zentralnervöser Regulationsmechanismen" an. Vor allem die *Leber* ist nach seinen späteren Experimenten dank ihrer beherrschenden Stellung im Pfortaderkreislauf in der Lage, den Einstrom der vom Darm kommenden exogenen Eisenquote in den übrigen Kreislauf und damit in das intermediäre Stoffwechselgeschehen zu regulieren. Ganz entsprechende regulierende Funktionen billigt man dem *RE* und der *Milz* als dessen Hauptrepräsentanten für das intermediär, z. B. aus dem Hämoglobinabbau, anfallende Eisen zu. Über die Einflußmöglichkeit einiger *inkretorischer Organe* (Schilddrüse, Nebennieren, Ovarien) herrschen noch sehr widerspruchsvolle Auffassungen. Heilmeyer, Keiderling und Stüwe (1941) haben einigen Hormonen und vegetativen Giften (Adrenalin, Atropin, Pilokarpin, Pretiron, Präphyson) die Fähigkeit abgesprochen, den Serumeisenspiegel zu verändern. Schäfer (a) hat kürzlich gezeigt, daß *Histamin* den Eisenspiegel nachhaltig zu senken vermag. Eine humorale Beeinflussung des Eisenstoffwechsels ist danach also grundsätzlich möglich. Alle diese Einzelbeobachtungen reichen natürlich nicht aus, die Annahme eines das Ganze beherrschenden Regulationsprinzips zu rechtfertigen. Vielmehr wird gewöhnlich der normale Ablauf des Eisenstoffwechselgeschehens als das Einspielen von Angebot und Nachfrage aufeinander unter Zuhilfenahme von Leber, Milz und übrigem RE als Depot- und Pufferorgane gedeutet. M. B. Schmidt schreibt 1940, daß der Mechanismus dieser Regulationen noch unbekannt ist.

Eigene Untersuchungen.

Wie oben eingehender begründet wurde, beschränkten wir uns auf *Messungen des Serumeisenspiegels* unter den nunmehr genauer zu schildernden Versuchsbedingungen. Wir bedienten uns dabei der Phenanthrolinmethode von Heilmeyer und Plötner mit geringfügiger Modifikation (vgl. Schäfer). In jedem Falle wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, indem jeweils aliquote Teile des Salzsäure-Trichloressigsäurefiltrates zum Ansatz der Farbreaktion verarbeitet wurden. Die Endmengen der Farblösungen lassen sich am einfachsten und exaktesten mit einer Stangenpipette messen, die über einen Gummischlauch mit einer Spritze aufgesaugt und dabei bequem abgelesen werden kann.

Die ersten Untersuchungen hatten die Frage zu klären, ob es durch *zerebral-erregende Eingriffe* gelingt, das *Serumeisen* zu verändern. Hierzu schien genügend Anlaß gegeben, nachdem wir bei einigen nichtentzündlichen, cerebralerregenden Erkrankungen (Commotio cerebri,

Ventrikelblutungen bei nephrogener Hypertonie und bei Unfällen) eine eindeutige *Hyposiderämie* gefunden hatten. Es war jedoch nicht ausgeschlossen, daß — wenigstens bei den Unfällen — die Hyposiderämie lediglich eine Folge der Schockwirkung war (SCHÄFER). Wir sind daher dieser Frage in systematischen Untersuchungen nachgegangen und fanden als 1. Serie die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 1. *Einfluß zerebralerregender Eingriffe auf das Serumeisen des Menschen und Kaninchens.*

Nr.	Serumeisen γ-%						Art des Eingriffs
	vorher	nach 15 min	nach 1 Std	nach 3 Std	nach 8 Std	nach 24 Std	
1	146	126	140	140	—	—	Lumbalpunktion
2	132	93	93	81	—	118	,,
3	99	75	—	88	—	—	,,
4	100	65	58	51	—	103	,,
5	175	159	148	150	—	189	,,
6	137	113	75	46	—	113	,,
7	129	95	99	100	—	—	,,
8	129	120	120	87	—	—	,,
9	131	102	—	140	—	—	Subokzipitalpunktion
10	123	110	122	137	—	—	,,
11	56	—	35	—	—	—	Ventrikelpunktion
12	137	—	114	93	—	131	Enzephalographie
13	46	—	33	—	23	26	,,
14	60	—	50	48	61	—	,,
15	68	71	44	58	13	28	,,
16	183	—	135	155	138	23 nach 24 Std 95 nach 48 Std 250 nach 72 Std	Enzephalographie Kaninchen
17	113	—	125	111	50	38 nach 24 Std 84 nach 72 Std	Enzephalographie Kaninchen

Es zeigt sich also, daß *Liquorentnahmen* und *Enzephalographien* von einer *Senkung des Serumeisens* gefolgt sind. Der Verlauf dieser Eisenspiegeldepression ist von Fall zu Fall recht verschieden. Am besten läßt sich das Ineinandergreifen verschiedener Hyposiderämieursachen am Beispiel der Enzephalographie studieren. Hierbei war von besonderem Interesse der zeitliche Ablauf dieser Serumeisenreaktion und ihre Korrelation zu den Veränderungen anderer Blutbestandteile, deren zentralnervöse Steuerung als sicher bekannt gelten kann (Abb. 1).

Das Wesentliche dieser Kurve ist die erste Serumeisenzacke 1 Std nach der Enzephalographie, die synchron mit der bekannten Blutzucker-, Leukozyten- und Retikulozytenerhöhung verläuft. Sie geht den unter der Kurvenabszisse versinnbildlichten meningealen Reizerscheinungen und ihren Auswirkungen auf Temperatur und Leukozytenzahl voraus. Die erste, etwa 5 Std währende Phase ist, wie BRENNER 1942 auf Grund seiner Untersuchungen von Blutdruck, Blutzucker, weißem

Blutbild und Liquorverhältnissen schrieb, auf den zentralen Reiz der Luftfüllung, die 2. Phase auf die nachfolgende sterile Reizmeningitis zu beziehen. Demgemäß finden auch wir 2 kurz aufeinanderfolgende abwärts gerichtete Serumeisenzacken, die sich geradezu spiegelbildmäßig zu der Leukozytenbewegung verhalten. Auch diese Kurve läßt also den *Schluß* zu, daß die *erste Serumeisenspiegelsenkung* einer *Reizwirkung des Eingriffs auf die vegetativen Stammhirnzentren* ihre Entstehung verdankt. Zu dem gleichen Schluß kommt Brenner, der in

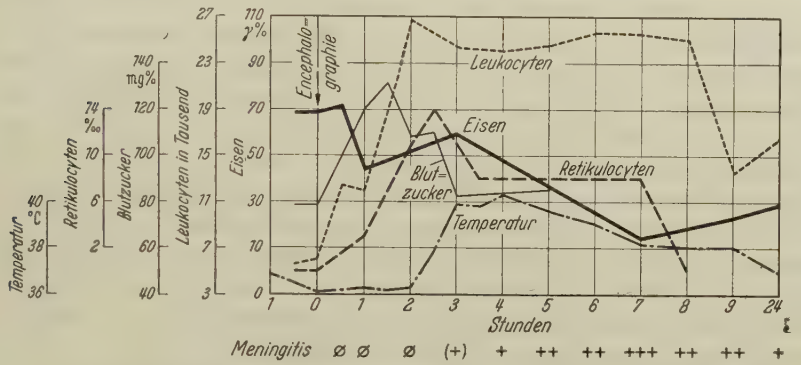


Abb. 1. Der Einfluß einer Enzephalographie auf Serumeisen, Leukozytenzahl, Retikulozytenzahl, Blutzucker und Körpertemperatur eines Kindes.

neuester Zeit ganz unabhängig von uns in allen 6 untersuchten Fällen den Serumeisenwert 3 Std nach der Enzephalographie erniedrigt fand.

Ähnliche Reaktionen des Serumeisenspiegels sahen wir nach *Kurzwellenbestrahlungen* der Stammhirngegend und auch nach *intravenösen Injektionen* einer *20%igen Aminophenazonlösung* („Anoixol").

Tabelle 2. *Der Einfluß intravenöser Injektionen von Anoixol (20% Aminophenazonlösung) auf das Serumeisen.* Das Anoixol wurde jeweils auf die in der Tabelle enthaltenden Mengen verdünnt und sehr langsam injiziert.

Nr.	Anoixol intravenös cm³	Serumeisen γ-% vorher	nach 1 Std	nach 6 Std	Bemerkungen
1	5,0—10,0	197	130	—	Chorea minor nach Rheumatismus verus
2	2,5—10,0	15	41	—	Pneumonie
3	3,0—12,0	90	40	—	Nephritis
4	3,0—15,0	35	24	—	Nephrose
5	4,0—20,0	73	64	—	Rheumatismus verus
6	3,0—6,0	86	71	—	Tuberkulose
7	3,5—7,0	138	62	72	Kokkenrheumatismus
8	4,0—8,0	89	50	65	Rheumatismus verus
9	2,0—4,0	44	48	—	Chronische Polyarthritis
10	4,0—8,0	68	36	60	Rheumatismus verus

Nach neuesten Untersuchungen von Nitsch stellen diese intravenösen Anoixolinjektionen einen beträchtlichen Eingriff in das vegetative Nervensystem mit zentralnervösem Angriffspunkt dar, auch wenn es dabei nicht zu Konvulsionen kommt. Und es ist nun interessant festzustellen, daß in 8 von 10 Versuchen eine schnelle und eindeutige Senkung des Serumeisenspiegels eingetreten ist. Nach 6 Std war in den wenigen Fällen, in denen dieser Wert gemessen werden konnte, der Tiefpunkt bereits überschritten. Die beiden negativ ausgefallenen Versuche wurden an Kindern vorgenommen, die schon vor der Anoixolinjektion eine erhebliche infektbedingte Hyposiderämie aufwiesen. Wie Heim kürzlich berichtet hat, ist die Reaktionslage des vegetativen Nervensystems zu Beginn solcher Versuche von sehr wesentlicher Bedeutung für ihren Erfolg. Es hat sich nämlich gezeigt, daß z. B. die Wirkung eines Sympathikomimetikums (Sympatol oder Adrenalin) eine viel ausgiebigere ist, wenn bei der Anwendung des Mittels ein relativ niedriger Sympathikotonus herrscht. Zu analogen Schlüssen kam Mies, als er mit Hilfe von Vestibularisreizen die Tonuslage des vegetativen Nervensystems zu beeinflussen suchte. Bei Berücksichtigung dieser Gegebenheiten kann es also nicht wundernehmen, daß der Anoixolversuch in den erwähnten beiden Fällen versagte.

Auf Grund der vorgelegten Untersuchungsergebnisse halten wir uns zu der Annahme berechtigt, daß es im Gehirn — wahrscheinlich im Stammhirn — Areale gibt, welche auf die verschiedensten Reize hin eisenspiegelsenkende Impulse aussenden.

Mit dem Ziel, die *vegetativen Bahnen* zu erkennen, auf denen die zentralangreifenden bzw. hier entstehenden Reize an die peripheren Erfolgsorgane herangetragen werden, wurde zunächst versucht, einen *Tagesrhythmus des Serumeisenspiegels* zu schreiben, und überdies der Einfluß *vegetativer Gifte* auf das Serumeisen studiert.

Tagesrhythmus des Serumeisenspiegels.

Die *24-Std-Rhythmik* ist ein biologisches Phänomen, welches den vitalsten Funktionsabläufen im Tier- und Pflanzenreich seinen Stempel aufdrückt. Sie bedingt die immer noch offene Kernfrage nach der Stellung des Einzelindividuums im Kosmos. Auf die zahlreichen, diesem Problem nachspürenden Arbeiten kann hier nicht ausführlich eingegangen werden. Nur einige in diesem Zusammenhang grundsätzlich wichtige Tatsachen seien hervorgehoben und im übrigen auf die zusammenfassende Arbeit von Jores (1935) und auf neuere Arbeiten von Menzel verwiesen.

Die Zahl der einem Tagesrhythmus unterworfenen biologischen Funktionen wächst zusehends, je mehr man auf diese Dinge zu achten gelernt hat. Unter anderem hat man den Blutkreislauf, die Nieren- und

Lebertätigkeit, die Atmung, die Magen-Darmtätigkeit, die Blutzusammensetzung und, was in Anbetracht der hier zur Erörterung stehenden Fragen besonders wichtig erscheint, auch die Körpertemperatur und den Sauerstoffverbrauch als dem Tagesrhythmus unterworfen erkannt. Wohl das augenfälligste tagesrhythmische Geschehen ist der Wechsel von Wachen und Schlafen, den man früher einmal als die Ursache und nicht, wie es heute die „Rhythmologen" allgemein tun, als eine von vielen Erscheinungen des 24-Std-Rhythmus angesprochen hat. Heute weiß man, daß der Grundrhythmus der tagesperiodischen Schwankungen auf der gesamten Erde an die Ortszeit ohne Rücksicht auf die Helligkeit oder Dunkelheit gebunden ist (H. Völker). Nur dann spricht Jores von echtem Tagesrhythmus. Er ist also im wesentlichen endogen, ohne deswegen von exogenen Faktoren völlig unabhängig zu sein. Bekannt ist ja der Einfluß geistiger und körperlicher Tätigkeit und der Nahrungsaufnahme auf Kreislauf, auf Wärme- und Verbrennungshaushalt. Die klarsten Tagesrhythmuskurven erzielt man daher bei möglichst weitgehender Ausschaltung exogener Faktoren während der Versuchszeit, also bei Körperruhe und Nahrungskarenz. Dann zeigt sich, daß die meisten Rhythmuskurven ihren Höhepunkt zwischen 15 und 20 Uhr und ihren Tiefpunkt zwischen 1 und 5 Uhr durchschreiten. Seit den Untersuchungen von Hess und L. R. Müller weiß man, daß das vegetative Nervensystem in diese Vorgänge eingreift, indem ein Sympathikotonus die Nachmittags- und frühen Abendstunden und ein Überwiegen des Parasympathikus die Nachtstunden beherrscht. Burckard, Dontcheff und Kayser haben schließlich bei Tauben durch Entfernung der Hirnhemisphären und Kauterisierung der Hypothalamusgegend den Tagesrhythmus auslöschen können und damit seine zentralnervöse Steuerung experimentell bewiesen. Woher nun die vegetativen Zentren im Stammhirn ihre Impulse empfangen, ist noch fraglich. Die erwähnte Ortszeitgebundenheit der Rhythmenabläufe läßt an kosmische Einwirkungen noch unbekannter Art denken.

Es schien uns nun erfolgversprechend, solche Erwägungen auf das Eisenstoffwechselgeschehen zu übertragen. In diesem Bestreben haben wir bei Menschen und größeren Laboratoriumstieren das *Verhalten des Serumeisenspiegels in Abhängigkeit von der Tageszeit* geprüft. Unsere Ergebnisse finden in Abb. 2 kurvenmäßige Darstellung.

Je 10 gesunde erwachsene Menschen, rekonvaleszente Kinder nach irgendwelchen Infektionen und ausgewachsenen Kaninchen wurden um 8, 11, 16, 18, 20 und 24 Uhr auf ihren Serumeisenspiegel untersucht. Die gesunden Erwachsenen waren Ärzte und Schwestern der Klinik, welche während des Versuchstages bezüglich Arbeit, Schlafen und Nahrungsaufnahme der gewohnten Lebensweise unterlagen. Die Rekonvaleszenten waren fieberfrei, hatten schon wieder normale oder doch

annähernd normale Blutsenkung und lagen während des Versuchstages fest im Bett. Sie hatten am Abend vorher die letzte Nahrung zu sich genommen und bekamen am Versuchstage selbst nur Tee und etwas Zwieback gereicht. Die Kaninchen schließlich hungerten völlig und blieben während des ganzen Versuchstages im dunklen Stall in einem engen Kasten, so daß exogene Reize — von den Blutabnahmen aus der Ohrvene abgesehen — weitgehend ausgeschaltet wurden. Um bei den Kaninchen den Anämisierungseffekt der relativ großen Blutentnahmen als Fehlerquelle auszuschließen, wurde der Versuch alternierend um 8 und um 18 Uhr begonnen. Dabei hat sich kein Unterschied gezeigt.

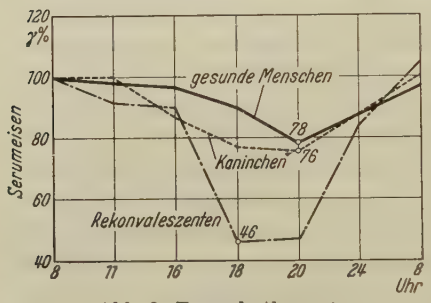


Abb. 2. Tagesrhythmus im Serumeisenspiegel.

Die Analysenergebnisse wurden für jede der oben erwähnten Tageszeiten als Durchschnittswerte berechnet und kurvenmäßig dargestellt. Dabei wurde der Ausgangswert der 3 Serumeisenkurven mit Hilfe geringfügiger prozentualer Umrechnungen auf 100 γ-% transportiert und so eine bessere Vergleichsbasis geschaffen. *Es zeigt sich nun in allen 3 Kurven eine statistisch gesicherte Senkung des Serumeisens in den späten Nachmittags- und frühen Abendstunden, also in der Zeit des tagesrhythmisch ausgelösten Sympathikotonus.* Die Tatsache, daß der Serumeisentagesrhythmus bei den Rekonvaleszenten ganz besonders ausgeprägt war, bedarf noch einer Erklärung. Vielleicht hat die weitgehende Körperruhe während des Versuches den Grundrhythmus besonders ungestört hervortreten lassen. Aber das würde bei den Kaninchen eher noch stärker der Fall gewesen sein. Darum bietet die zweite Erklärungsmöglichkeit mehr Wahrscheinlichkeit, daß nämlich bei den rekonvaleszenten Kindern eine noch infektbedingte besondere Ansprechbarkeit des vegetativen Nervensystems oder aber auch der Eisenstoffwechselorgane selbst auf den in üblicher Stärke eintreffenden sympathischen Reiz besteht. Welcher Art diese Erfolgsorgane der sympathischen Reizwirkung sind, wird später noch zu diskutieren sein.

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir den Einflußbereich *exogener Faktoren auf den Serumeisentagesrhythmus* abzugrenzen gesucht. Zu diesem Zwecke haben wir bei 8 Schwestern der Klinik nach 14tägiger *Nachtwachentätigkeit* und gut 3 Wochen nach der Umgewöhnung auf den üblichen *Tagesdienst* an je einem bestimmten Stichtag um 8,30 Uhr und um 18 Uhr den Eisenspiegel untersucht. Das Ergebnis findet sich in Abb. 3.

Es ist offenkundig, daß in 7 von 8 Fällen eine Umkehr des Serumeisentagesrhythmus während der Nachtwachenzeit bestanden hat. Die einzige Ausnahme hiervon bildet die Schwester E. B., welche auch im Tagesdienst (T_1) wie in der Nachtwachenzeit (N) morgens einen niedrigeren Serumeisenspiegel aufwies als abends. Nach weiteren 3 Wochen (T_2) war aber auch bei dieser Versuchsperson der übliche Tagesrhythmus im Eisenspiegel wiederhergestellt.

In der Literatur finden sich nur sehr wenige auf systematischen Untersuchungen basierende Angaben über spontane Tagesschwankungen des Eisenspiegels. Meist wurde diese Frage immer nur in wenigen Einzelfällen geprüft. So finden wir bei Skouge in 2 untersuchten Fällen eine gewisse Verminderung der Eisenwerte in den Nachmittags- und Abendstunden. Das eindeutigste Ergebnis stammt von Vahlquist, der bei 15 gesunden Männern den Eisenspiegel von 8 Uhr früh mit demjenigen von 18 Uhr verglich und dabei eine statistisch gesicherte Verminderung um $36{,}3 \pm 9{,}2\ \gamma$-% ermittelte. Nur in 2 Fällen zeigte sich ein entgegengesetztes Verhalten des Serumeisens. Über die äußeren Bedingungen, denen die Versuchspersonen unterworfen waren, findet sich keine Angabe, was wohl in dem Sinne spricht, daß keine besonderen Maßnahmen getroffen wurden.

Die Vahlquist*schen Ergebnisse lassen also in Übereinstimmung mit den unsrigen einen Eisenspiegeltagesrhythmus mit hohen Morgen- und tiefen Abendwerten erkennen.* Auch Wetzel beschreibt eine tagesrhythmische Eisenspiegelkurve; ihr Verlauf ist jedoch dem eben beschriebenen gerade entgegengesetzt. Dieser Autor findet bei 6 Erwachsenen während 24stündiger Körperruhe und Nahrungskarenz hohe Werte spät am Tage und tiefe Werte morgens und in der Nacht. In 5 weiteren Fällen zeigten sich

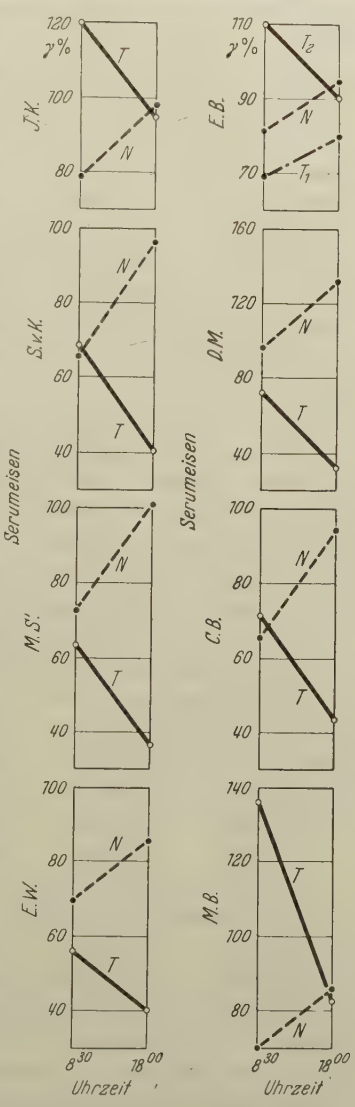


Abb. 3. 24-Std-Rhythmik im Serumeisen bei einigen Krankenschwestern im Tages- (T) und Nachtdienst (N).

bei normaler Nahrung völlig regellose Serumeisentageskurven. Wir vermögen für diesen Widerspruch keine rechte Erklärung zu finden, möchten aber an der Realität der Vahlquistschen und der eigenen Befunde mit Rücksicht auf die viel größere Zahl der Untersuchungen festhalten, zumal wir nicht nur bei Menschen und Kaninchen, sondern auch bei 6 Katzen und 5 Hunden einen Serumeisentagesrhythmus im oben geschilderten Sinne erkennen konnten. Natürlich gibt es wie bei allen Tagesrhythmen auch Ausnahmen von dieser Regel. So beobachteten wir unter anderem bei einem Schäferhund bei fünffacher Untersuchung stereotyp einen umgekehrten Rhythmus. Aber es handelt sich hierbei um Ausnahmen von dem Regelfall. Damit kommen wir zu der Frage nach der Echtheit der Eisenspiegeltagesrhythmen. Die Tatsache, daß der *Rhythmus* durch veränderte äußere Umstände (Nachtwache) stark zu beeinflussen, ja umzukehren ist, könnte dazu verleiten, seine *Echtheit* anzuzweifeln. Uns scheinen aber diese Feststellungen nur zu dokumentieren, daß das Eisenstoffwechselgeschehen exogenen Einflüssen ganz besonders unterliegt. Jedenfalls nimmt es uns nicht wunder, daß Nahrungsaufnahme und Verdauungstätigkeit, körperliche und geistige Arbeit, akustische und optische Reize sich auf den Umsatz des Biokatalysators Eisen auswirken. Das zeigen unter anderem die Untersuchungen von Merz, welche bei körperlichen Anstrengungen eine Vermehrung des Gewebeeisens, zum Teil auf Kosten des Serumeisens, aufdeckten. Damit ändert sich aber nichts an der Tatsache, daß der bei Körperruhe und Nüchternheit ungestört zutage tretende Grundrhythmus des Eisenspiegels durch einen niedrigen Wert in den Nachmittags- und frühen Abendstunden und durch einen hohen Wert in den späten Nacht- und Morgenstunden gekennzeichnet ist. Wir entnehmen daraus die für uns wichtige Tatsache, daß Sympathikotonus offensichtlich mit einer Verminderung des Eisenspiegels einhergeht.

Vegetative Gifte.

Die Untersuchung einiger vegetativer Gifte bzw. Hormone in ihrer Einflußnahme auf das Serumeisen brachte eine Bestätigung der im letzten Satz enthaltenen Feststellung. Geprüft wurden *Suprarenin* (5 Untersuchungen), *Atropin* (10 Untersuchungen), *Ergotamin*, *Acetylcholin* und *Physostigmin* (je 5 Untersuchungen) an stoffwechselgesunden älteren Kindern und Erwachsenen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe und die zeitliche Durchführung der Experimente zeigt die Abb. 4 in Gestalt von 5 Durchschnittskurven.

Wie die Kurven klar zum Ausdruck bringen, übt *vor allem das Suprarenin* in der Dosierung von 0,5—0,6 mg intramuskulär einen *Einfluß auf den Eisenspiegel im Sinne einer Senkung* aus. Wir fanden bei einem Ausgangswert von $95 \pm 3{,}92\ \gamma$-% nach 30 min $102 \pm 2{,}47\ \gamma$-%, nach

1 Std 89 $\pm$ 5,56 γ-%, nach 3 Std 74 $\pm$ 3,48 und nach 7 Std 87 $\pm$ 7,40 γ-%. Während die Erniedrigung des 3-Std-Wertes eine signifikante Differenz $\left(\frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}} = > 3\right)$ darstellt, wird diese statistische Sicherung bei der leichten Erhöhung des 30-min-Wertes vermißt (sign. Diff. < 2). Auch Atropin- und Ergotamininjektionen sind von Serumeisensenkungen gefolgt. Allerdings ist diese erst 7 Std nach der Injektion, also um 16 Uhr deutlich werdende Depression nicht sicher zu beurteilen, weil sie zu einer Zeit eintritt, wo der Eisenspiegel tagesrhythmisch bedingt spontan abfällt. Vor allem ist bemerkenswert, daß ein entgegengesetzter, nämlich erhöhender Effekt durch die sog. Parasympathikomimeticis vermißt wird. *Es ergeben sich aus unseren Untersuchungen also Anhaltspunkte, daß die Serumeisenverminderung nur Impulsen folgt, die vom sympathischen System ihren Ausgang nehmen.* Der Widerspruch zu den Ergebnissen von Oliva und Furbetta ist nur scheinbar. Diese Autoren fanden nämlich in der 1. Std nach Suprarenininjektion — länger wurde offenbar nicht untersucht — eine nur geringe aber immer im gleichen Sinne einer leichten Erhöhung ablaufende Schwankung des Serumeisens. Das kommt ja auch in unserer Kurve andeutungsweise, wenn auch nicht signifikant, zum Ausdruck. Und wir möchten uns der Auffassung dieser Autoren anschließen, daß an dieser Erhöhung vor allem die Milz beteiligt ist.

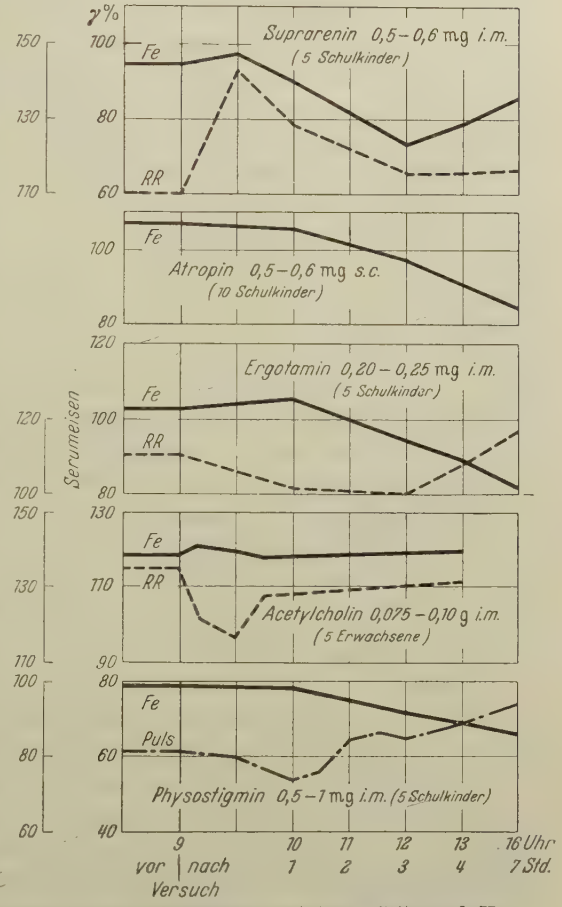


Abb. 4. Einfluß einiger vegetativer Gifte und Hormone auf den Serumeisenspiegel des stoffwechselgesunden Menschen.

Wir haben nämlich an anderer Stelle berichtet, daß das Blut der Milzvene aus begreiflichen Gründen einen höheren Eisenspiegel besitzt, als das Blut der Milzarterie. So ist es verständlich, daß eine durch Suprarenin ausgelöste und mit der Blutdruckerhöhung synchron (siehe Kurve) verlaufende Milzkontraktion den Eisenspiegel zu heben vermag. *Die von uns beschriebene Eisenspiegelsenkung hingegen tritt viel später ein, wenn die Kreislaufwirkung des Mittels längst verpufft ist. Sie muß also einem anderen Mechanismus ihre Entstehung verdanken.* Diese Feststellung erscheint uns wichtig, nachdem Straub und Stefansson am Blutdruckgeschehen eine antagonistische Wirkung von Ferroionen und Adrenalin beschrieben. Sie gelangten in tierexperimentellen Untersuchungen zu der Auffassung, daß injizierte Ferroionen die Gefäße für eine Adrenalinwirkung unempfindlich machen und dadurch einen blutdrucksenkenden Effekt ausüben. Andererseits machten Wilke und Conrath in Versuchen an der dekapitierten und nichtdekapitierten Katze wahrscheinlich, daß nach intravenösen Injektionen von Ferrosalzen auf die oft geringe Blutdrucksenkung alsbald eine auf Adrenalinausschüttung beruhende Milzkontraktion und Steigerung des Blutdruckes folgte. Es bestehen also offensichtlich verschiedenartige Wechselbeziehungen zwischen Eisen und Adrenalin, wenn man nicht gerade annehmen will, daß der Organismus das Serumeisen heranzieht, um die Blutdruckwirkung des Adrenalins zu paralysieren (vgl. Straub und Stefansson) bzw. die Adrenalinwirkung dazu benutzt, um die durch die Injektion von Eisensalzen erzwungene Serumeisenerhöhung schnell zu beseitigen (vgl. Wilke und Conrath).

Das retikuloendotheliale System (RES) als Regulationsorgan für den Eisenstoffwechsel.

Die Bedeutung des RES für den Eisenstoffwechsel wurde eingangs ausführlich erörtert. Hier handelt es sich nurmehr um die Klärung der Frage, ob dieses im Körper praktisch ubiquitäre Stoffwechselorgan in die bisher zutage getretene zentralnervös-vegetative Senkung des Eisenstoffwechsels eingeschaltet ist, ob mit anderen Worten das RES das oben bereits diskutierte Erfolgsorgan sympathischer Reizwirkung darstellt, welches den eisenspiegelsenkenden Effekt vermittelt, oder ob das autonome Nervensystem in unmittelbare Beziehung zum Eisenstoffwechselgeschehen zu treten vermag.

Uns schien auch hier wieder der *Serumeisentagesrhythmus* der geeignete Test zu sein. Vahlquist, dem ja gleich uns die spontane Eisenspiegelminderung in den späten Nachmittagsstunden aufgefallen war, neigte dazu, diesen Vorgang mit rhythmischen Schwankungen in der Hämopoese zu erklären. Doch konnte er diese Vermutung, worauf

er selbst ausdrücklich hinweist, durch parallel aufgestellte Tageshämoglobinkurven nicht beweisen. Auch diese Kurve zeigte nach seinen Untersuchungen in der Zeit zwischen 8 und 18 Uhr eine leichte Senkung. Es ist das der schon seit Leichtenstern (1878), Reinert (1891) bekannte und immer wieder bestätigte (Jores, Menzel u. a.) Befund, welcher mit einer tagesrhythmisch bedingten Zunahme des Blutwassergehaltes in Verbindung gebracht wird. Er findet erst tief in der Nacht seinen Höhepunkt und kann schon aus diesem Grunde nicht die Eisenspiegelsenkung der Nachmittags- und frühen Abendstunden erklären. Vermehrter Eisenbedarf in den Blutbildungsstätten müßte überdies zu einer Erhöhung und nicht zu einem Absinken der Hämoglobin- und Erythrozytenwerte führen. *Wir wandten darum unser Interesse dem RES als dem nächstwichtigen Eisenstoffwechselorgan zu.*

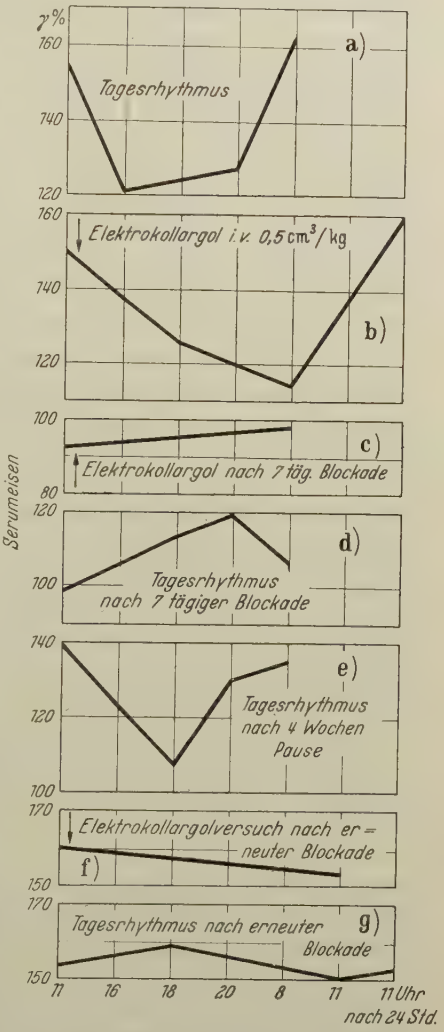


Abb. 5. Auslöschung des Serumeisentagesrhythmus durch sog. RES-Blockade beim Kaninchen.

Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß die Auswirkungen des den Tagesrhythmus in den Nachmittags- und Abendstunden beherrschenden Sympathikotonus auf den Eisenspiegel paralysierbar sein müssen, wenn man die Retikuloendothelien funktionell blockiert. Aus früheren Untersuchungen wußten wir, daß man durch eine einzige kleine intravenöse Dosis von Elektrokollargol das RES zur Eisenaufnahme aus dem Serum anreizen und durch oftmals wiederholte größere Dosen für die weitere Eisenaufnahme sperren, also „blockieren" kann. Abb. 5 bringt die an einem Albinokaninchen ermittelten Serumeisenkurven als Beispiel von insgesamt 3 solchen Versuchen mit ausgesprochen gleichsinnigen Ergebnissen.

Zu Beginn des Versuches zeigt sich zunächst ein sehr ausgeprägter Serumeisentagesrhythmus (Kurve a). Auf die 1. intravenöse Injektion von 4 cm³ Elektrokollargol (s. Pfeil an der Kurve b) folgt der seit den Arbeiten von THOENES und ASCHAFFENBURG und von BARKAN bekannte Abafll des Eisenspiegels mit Tiefpunkt nach 21—24 Std. Dann wurden die Injektionen täglich wiederholt und hatten zur Folge, daß auf die 7. Injektion keine Eisenspiegelreaktion mehr erfolgte (Kurve c). Das war uns ein Zeichen dafür, daß das RES für den Eisenstoffwechsel blockiert war. Der nunmehr geschriebene Eisenspiegeltagesrhythmus (Kurve d) nahm in der Tat einen völlig anderen Verlauf als in der Kurve a gezeichnet. Der Tagesrhythmus war ausgelöscht, um allerdings nach 4 Wochen „blockadefreier" Pause wiederzukommen (Kurve e). Erneute Blockade führte wiederum zur Nivellierung der Eisenspiegeltageskurve (f und g). Dieses Mal vergingen fast 2 Monate, bis der Tagesrhythmus wieder deutlich zum Ausdruck kam. *Man kann also den Tagesrhythmus durch eine sog. Retikuloendothelblockade vorübergehend auslöschen. Und es besteht demnach kein Zweifel, daß der im Rahmen des Tagesrhythmus wirksam werdende Sympathikotonus mit Hilfe des RES den Serumeisenspiegel absinken läßt.*

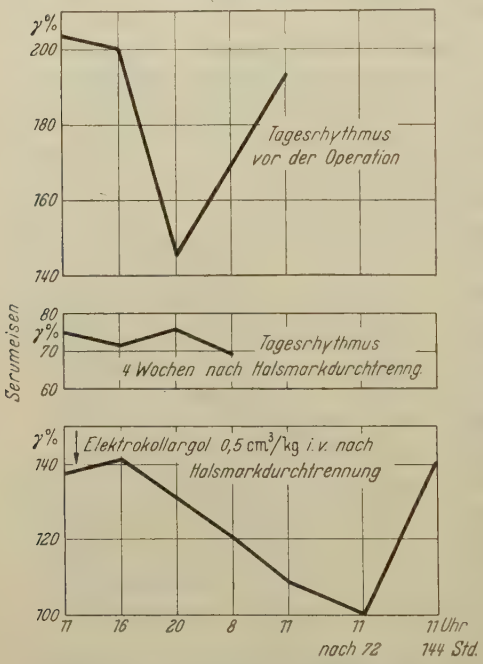


Abb. 6. Eisenspiegeltagesrhythmus beim Kaninchen vor und nach Halsmarkdurchtrennung.

Die vom Zentralnervensystem über das RES zum Eisenstoffwechsel führenden Bahnen.

In der Weiterführung unserer Gedankengänge interessierte die Frage, ob die tagesrhythmischen Impulse für den Eisenstoffwechsel bzw. für den Serumeisenspiegel von den vegetativen Zentren im Hirnstamm oder aber von niederen Zentren ausgehen. Zu ihrer Klärung haben wir den Einfluß der *Halsmarkdurchtrennung* auf den Serumeisentagesrhythmus studiert. Abb. 6 soll als Beispiel unserer Versuche gelten. Die Operationen wurden mit der üblichen Technik (vgl. THAUER)

in Pernoctonnarkose ausgeführt. Sie gelangen bei 2 *Kaninchen* und bei 1 Hund. Die Ergebnisse der Kaninchenversuche glichen sich in allen wesentlichen Punkten. Von dem Hundeversuch wird weiter unten noch die Rede sein.

Die Abb. 6 zeigt sehr eindrucksvoll, wie der zu Versuchsbeginn sehr ausgeprägte Serumeisentagesrhythmus durch die Unterbrechung des Rückenmarkes in Höhe des 5. Halswirbels ausgelöscht war, wie allerdings eine intravenöse Injektion von Elektrokollargol (s. Pfeil der letzten Kurve) zu einer sehr ausgeprägten und besonders lang anhaltenden Senkung des Eisenspiegels führt. *Die Halsmarkdurchtrennung hat also die Verbindung vom Zentralnervensystem zum RES unterbrochen, hat aber nicht die Erregbarkeit des letzteren von der Blutbahn her zu beeinträchtigen vermocht.*

In dem bereits erwähnten *Hundeversuch* wurde die Rückenmarksdurchtrennung absichtlich etwas tiefer, nämlich in Höhe des 1. Brustwirbels ausgeführt. Danach zeigte sich zunächst das vollständige Bild der Querschnittslähmung einschließlich der Thoraxmuskulatur (paradoxe Atmung) und der vorderen Extremitäten. Schon nach wenigen Tagen aber begannen sich in den vorderen Gliedmaßen und in den oberen Segmenten der Thoraxmuskulatur die ersten Anzeichen einer aktiven Bewegungsfähigkeit bemerkbar zu machen. Das steigerte sich im Verlauf der nächsten Wochen soweit, daß der Hund sich auf den Vorderpfoten einigermaßen aufrichten und auch in den kraniellen Abschnitten wieder etwas thorakal atmen konnte. Alle kaudal hiervon gelegenen Körperabschnitte mit Einschluß der Blasenentleerungsfunktion blieben freilich völlig gelähmt. Die Prüfung des Eisenspiegeltagesrhythmus in den einzelnen Phasen dieses Versuchsablaufes hatte ein entsprechendes und gut in den Rahmen unserer bisher entwickelten Gedanken passendes Ergebnis (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Serumeisentagesrhythmus bei einem Hunde vor und nach Rückenmarkdurchtrennung in Höhe des 1. Brustwirbels.*

Datum	Serumeisen γ-% Uhrzeit der Messung					Bemerkungen
	8 Uhr	10 Uhr	16 Uhr	18 Uhr	8 Uhr	
14./15. 8.	180	163	133	130	198	vor der Operation
6. 8.	Rückenmarkdurchtrennung in Höhe des 1. Brustwirbels					
10./11. 8.	108	—	103	126	102	nach Operation
29./30. 8.	178	—	144	120	171	„ „
8./9. 10.	215	—	122	90	204	„ „

Es zeigt sich, wie der vor der Operation sehr ausgeprägte Tagesrhythmus des Serumeisens postoperativ zunächst erlischt, um dann aber im Verlaufe von wenigen Wochen, also im großen und ganzen parallel

zur Rückbildung der motorischen Ausfälle in den vorderen Körperpartien zurückzukehren. Ganz analog war die Reaktion des Tieres auf Pyrifergaben. Bereits 10 Tage nach der Operation wurde die Injektion in der üblichen Weise mit hohem Fieber (bis 41,2°) und starkem Serumeisensturz beantwortet. Wir stellen uns das so vor, daß die unteren Segmente des Halsmarkstumpfes, welche bekanntlich die Verbindung zum Halssympathikus aufnehmen, durch das Operationstrauma soweit in Mitleidenschaft gezogen wurden, daß sie vorübergehend funktionell ausfielen. Die Brustmarkdurchtrennung hat also im Gegensatz zur Halsmarkdurchschneidung die offenbar über den Sympathikus laufende Verbindung von den vegetativen Zentren des Stammhirns zum RES nur temporär unterbrechen können. Vom unteren Halsmark über den intakt gebliebenen Halssympathikus wurde diese zunächst blockierte Verbindung nach kurzer Zeit wieder aufgenommen.

So glauben wir mit den vorstehenden Versuchen am Beispiel des Serumeisentagesrhythmus erwiesen zu haben, daß die vom Stammhirn ausgehenden Impulse für den Eisenstoffwechsel über die Medulla oblongata zum Rückenmark und von hier über den Sympathikus zum RES laufen.

Die Frage der Autonomie des RES als Eisenstoffwechselorgan.

Haben unsere bisher erörterten Untersuchungen die Möglichkeiten zentralnervöser Einflußnahme auf das Eisenstoffwechselgeschehen unter Beweis gestellt, so bleibt noch zu klären, wie weitgehend die Auswirkungen dieses zentralnervösen Stoffwechselregimes sind. Der weiter oben erwähnte und aus der Abb. 6 zu entnehmende Befund, daß beim Halsmarkkaninchen trotz Auslöschung des Tagesrhythmus durch eine intravenöse Injektion von Elektrokollargol eine tiefe Eisenspiegelsenkung erzielt werden konnte, läßt eine gewisse Autonomie des RES, das ja schließlich für die Serumeisendepression verantwortlich ist, durchblicken. In dem Bestreben, diese Autonomie zu beweisen, schien es uns erforderlich, *jegliche* zerebrale Einflußnahme zu unterbinden. Aus diesem Grunde setzten wir die Versuche an *dekapitierten Katzen* fort.

Insgesamt 5 Katzen wurden nach der üblichen Technik (Storm van Leuwen) in Äthernarkose dekapitiert. In 3 Fällen gelang es, die Operation bei geringem Blutverlust so schonend durchzuführen, daß die Tiere den Eingriff mindestens 6 Std überlebten. Kreislaufmittel, die ja im allgemeinen vegetative Gifte darstellen, wurden grundsätzlich vermieden, weil sie den Stoffwechselversuch hätten stören können. Als RES-Reiz wurde Überhitzungsfieber gewählt, weil auf diese Weise beim intakten und dann beim operierten Tier leicht und ohne wesentlichen Zeitverlust Fieber in beliebiger Höhe zu erzeugen war. Nach Godon und Reginster kann man auch auf diese Weise eine Hyposiderämie hervorrufen. Den bestgelungenen Versuch dieser Art gibt die Abb. 7 wieder.

Die gestrichelte Kurve stellt die Serumeisenwerte des *intakten Tieres* — es war ein sehr kräftiger Kater — vor der Hyperthermie, nach 3 Std Überhitzungsfieber und nach der Entfieberung dar. Wir sehen ein Absinken von 80 auf 25 γ-% und alsbaldigen Wiederanstieg nach dem Temperaturrückgang auf 85 γ-%. Eine Woche später wurde der gleiche Versuch am dekapitierten Tier wiederholt. Die ausgezogene Kurve zeigt ein Absinken des Eisenspiegels von 105 auf 82 γ-% durch die *Operation* als Schockfolge (vgl. Schäfer). Die für unseren Versuch entscheidende weitere Verminderung des Serumeisens auf 45 γ-% wird nach 3 Std Hyperthermiedauer erreicht, um dann alsbald nach der Entfieberung einer Erhöhung auf 225 und schließlich auf 362 γ-% im Augenblick des Todes Platz zu machen. Die in den beiden letzten Werten zum Ausdruck kommende Hypersideräämie wird verständlich, wenn man bedenkt, daß das Tier in den letzten $1^1/_2$ Std des Versuches praktisch moribund ist. Das unter anderem auch in seiner Stoffwechselfunktion erlahmende RES gibt das vorher aufgesogene Eisen frei. Dieser Erklärung entspricht die klinische Erfahrung, daß schwerstkranke Patienten trotz fieberhaften Infektes einen normalen oder erhöhten Eisenspiegel haben können.

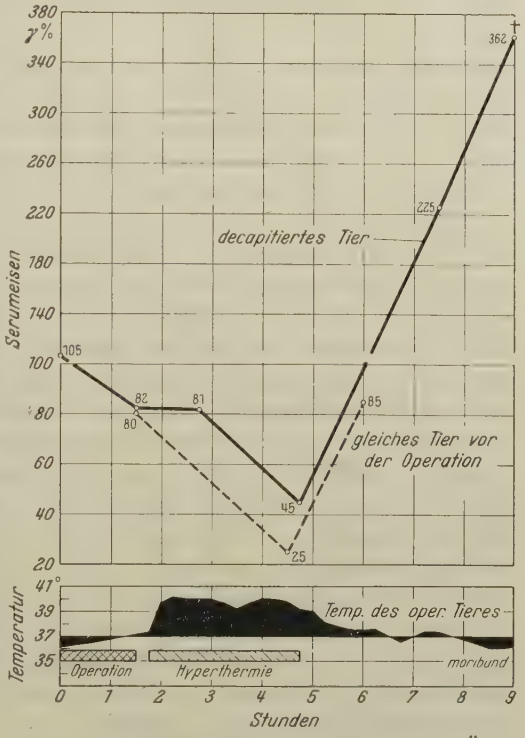


Abb. 7. Serumeisenkurve im Verlaufe von Überhitzungsfieber bei der decapitierten Katze vor und nach der Operation.

Es bleibt also die Tatsache bestehen, daß auch nach völliger Ausschaltung zerebraler Regulationszentren das RES voll reaktionsfähig bleibt, wenn es nur entsprechend, d. h. von der Peripherie her angesprochen wird. Unsere Versuche geben allerdings keine Auskunft darüber, wieweit niedere Zentren des sympathischen Systems an diesem Reaktionsablauf beteiligt sind oder ob das RES funktionell völlig autark sein kann.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Wir haben im *Eisenumsatz* ein *weiteres Stoffwechselgebiet* kennengelernt, welches *zentralnervös ausgelösten Impulsen* folgt. Zu dieser Auffassung brachte uns die Erkenntnis, daß die verschiedensten zerebralerregenden Erkrankungen und Eingriffe wie Commotio cerebri, Ventrikelblutung, Liquorentnahmen, Enzephalographien, Kurzwellenbestrahlungen der Stammhirngegend und auch intravenöse Injektionen von Anoixol (20%ige Aminophenazonlösung) von einer Hyposiderämie gefolgt sind. Der zeitliche Ablauf einer solchen Serumeisenreaktion und ihre Korrelation zu den Veränderungen anderer Blutbestandteile wie Blutzucker, Leukozyten, Retikulozyten, deren zentralnervöse Steuerung außer Zweifel steht, ließ sich am Beispiel der Enzephalographie besonders eindrucksvoll demonstrieren.

In dem Bestreben, die *vegetativen Bahnen* zu erkennen, auf denen die zentral angreifenden bzw. hier entstehenden Reize die peripheren Eisenstoffwechselorgane erreichen, gelang es, einen *Eisenspiegeltagesrhythmus* zu schreiben. Dieser war durch einen *Serumeisenabfall* in den späten Nachmittags- und frühen Abendstunden, also *zur Zeit des Sympathikotonus*, und durch einen Wiederanstieg mit dem Einsetzen des nächtlichen Vagotonus charakterisiert. Auch die Prüfung einiger *vegetativer Gifte* in ihrer Einflußnahme auf das Serumeisen ließ uns nur nach *Gaben von Suprarenin* — dem chemischen Überträgerstoff sympathischer Reizwirkung — eine *Hyposiderämie* erkennen. *Somit wurde offenbar, daß die Serumeisenverminderung Impulsen folgt, welche über das sympathische System laufen.*

Über den genauen *Sitz der eisenstoffhaltigen Zentren* geben unsere bisherigen Untersuchungen noch keine klare Auskunft. Sicher ist allerdings, daß sie oberhalb des Halsmarkes liegen müssen, da sich der Serumeisentagesrhythmus beim Kaninchen und beim Hunde durch Halsmarkdurchtrennung hat auslöschen lassen. Und da kommt praktisch nur die Medulla oblongata oder, was viel wahrscheinlicher ist, die *Hypothalamusgegend* in Betracht. Von hier läuft also der Reiz über die Medulla oblongata zum Hals- und sonstigen Rückenmark und weiter über das sympathische System zur Peripherie. Er muß schließlich im RES enden, weil sich der Serumeisentagesrhythmus durch große intravenöse Elektrokollargolgaben, also mittels sog. Retikuloendothelblockade, ebenfalls unterbrechen läßt. Das RES stellt also das periphere Erfolgsorgan für die Eisenstoffwechselimpulse zentralnervösen Ursprungs dar.

Auf die Frage, ob in die hypothalamiko-spinale und weiter bis zum RES fortgeführte Bahn noch *humorale Überträgermechanismen* eingeschaltet sind, können wir im Augenblick nur mit Analogieschlüssen antworten. Und zwar in dem Sinne, daß es für das Serumeisen nicht anders

sein wird als für andere zentralgesteuerte Blutbestandteile, welche nach den Untersuchungen von Hoff und von Beer einer solchen kombinierten nervös-humoralen Regulation unterliegen. Welches Organ auf den zentralnervösen Reiz den entscheidenden Wirkstoff absondert, läßt sich einstweilen nur mutmaßen. Beer hat sich auf Grund seiner umfangreichen experimentellen Untersuchungen über die Regulation der Leukozyten für die Leber ausgesprochen. Wir denken in unserer Fragestellung auch an die Nebennieren, ohne jedoch für diese Vermutung einstweilen Beweise beibringen zu können. Jedenfalls würde sich diese Annahme am ehesten in den Rahmen unserer oben entwickelten Anschauungen über die Eisenstoffwechselregulation einfügen. Bemerkenswert ist nämlich in dieser Hinsicht die Tatsache, daß auch der Gehalt des Blutes an Adrenalin tagesrhythmischen Schwankungen unterliegt; er ist in der Nacht während des Schlafes niedriger als am Tage (Heilig und Hoff) und erreicht seinen Höhepunkt zwischen 16 und 21 Uhr (Holmquist, v. Euler und Holmquist). Die Beziehungen zum Eisenspiegeltagesrhythmus sind unverkennbar.

Wir sind weit davon entfernt, in unseren Versuchen den Nachweis eines speziellen „Eisenzentrums" im Hypothalamus zu erblicken. Vielmehr glauben wir nur bewiesen zu haben, daß es im Gehirn (wahrscheinlich im Stammhirn) Areale gibt, welche auf die verschiedensten Reize hin Impulse aussenden, die unter anderem auch den Eisenspiegel senken. Diese hyposiderämische Reaktion ist den übrigen bisher bekannten Folgeerscheinungen zentraler Reizwirkung (z. B. Verminderung von Blutcholesterin und Alkalireserve, Erhöhung von Blutzucker und Kalorienverbrauch, von neutrophilen Leukozyten und Retikulozyten) koordiniert. Wir möchten daher die Infekthyposiderämie in die durch Übergewicht des Sympathikus charakterisierte 1. Phase der vegetativen Regulationsvorgänge bei infektiösem Fieber nach Hoff einfügen. Uns erscheint es allerdings noch fraglich, ob wir alle diese vegetativen Reaktionsabläufe mit Hoff als Abwehrvorgänge oder aber nur als ihre unvermeidliche Folge anzusprechen haben. Es ist zweifellos sehr wichtig für diese Frage, daß eine für die Infektabwehr elementare Funktion des RES, seine Phagozytosefähigkeit, ebenfalls direkter zerebraler Beeinflussung unterliegt (Sakamoto, Benetato, Oprisiu und Bociu). Über diese Zusammenhänge sollen uns weitere in Gang befindliche Untersuchungen Aufklärung bringen.

Mag also unter normalen Verhältnissen die durch Hyposiderämie gekennzeichnete Eisenstoffwechselreaktion auf infektiöse oder diesen gleichzusetzenden Noxen neurovegetativ gesteuert ablaufen, so haben uns doch weitere Versuche darüber aufgeklärt, daß dieser *zentrale Steuerungsmechanismus keine Totalitätsansprüche* stellt. Diese Erkenntnis gewannen wir an *dekapitierten Katzen*, die vor und nach dem Eingriff

in gleicher Weise auf Überhitzungshyperthermie mit einer tiefen Senkung des Serumeisens reagierten. Des weiteren an einem *Halsmarkkaninchen*, das trotz Auslöschung des Tagesrhythmus auf eine intravenöse Elektrokollargolgabe mit der üblichen Hyposiderämie reagierte. Das RES bleibt also auch nach völliger Ausschaltung aller zerebralen Regulationszentren stoffwechselaktiv. Es kommt nur darauf an, daß es in der richtigen Weise, in diesem Falle von der Peripherie her, in den erforderlichen Reizzustand versetzt wird, und es ist nicht unbedingt notwendig, daß alle diese Reize über die vegetativen Zentren laufen.

Anmerkung bei der Korrektur. Erst während der Drucklegung dieser Arbeit erschienen zwei sehr interessante Studien von Thedering [Z. inn. Med. **3**, 547 (1948); Klin. Wschr. **1949**, 496], welche sich auch mit der vegetativen Steuerung des Serumeisenspiegels beschäftigen. Der Autor konstatiert hier die Abhängigkeit des Serumeisentagesrhythmus vom Ausgangsniveau des Eisenspiegels im Sinne des Wilderschen Ausgangswertgesetzes. Die erneute Überprüfung unserer allerdings vornehmlich an Kindern geschriebenen Versuchsprotokolle läßt diese Abhängigkeit nicht so eindeutig hervortreten (vgl. auch die Abb. 3); womöglich gelten im Kindesalter andere Gesetzmäßigkeiten, zumal beim Kinde der normale Eisenspiegel wesentlich niedriger liegt als beim Erwachsenen. Auch soll dem Eindruck vorgebeugt werden, daß in den Versuchen der Abb. 6 und der Tabelle 3 nur die Gültigkeit des Wilderschen Gesetzes eine Auslöschung des Tagesrhythmus durch die Rückenmarkdurchtrennung vorgetäuscht hat. Jedenfalls hat der parallel durchgeführte zweite Kaninchenversuch die klare Auslöschung des Rhythmus ergeben, obwohl sich das Ausgangsniveau des Serumeisens vor und nach der Operation etwa in der gleichen Höhe, nämlich um 130 γ-%, befand. Die Blockadeversuche (Abb. 5) lassen an der Echtheit der Ergebnisse ebenfalls keinen Zweifel (s. Kurventeil d und g und weiteren Verlauf der Versuche, die nicht mehr abgebildet wurden).

Literatur.

Barkan: Z. physiol. Chem. **171**, 194 (1927). — Klin. Wschr. **1938 I**, 671.— Beer: Klin. Wschr. **1938**, 1395. — Z. exper. Med. **105**, 53; **106**, 67. — Fol. hämat. (D.) **66**, 222 (1942). — Benetato, Oprisiu and Bociu: J. Physiol. (Brit.) **39**, 191 (1947). — Brenner: Z. Kinderhk. **63**, 151 (1942); **66**, 14 (1948). — Burckard, Dontcheff et Kayser: Ann. Physiol. (Fr.) **9**, 303 (1933). Ref. Kongr.zbl. inn. Med. **74**, 27 (1934). — Euler, v. u. Holmquist: Pflügers Arch. **234**, 210 (1934). — Fontès et Thivolle: C. r. Soc. Biol. **93**, 687 (1925). — Gillman u. Jvy: Gastroenterology **9**, 162 (1947). — Godon et Reginster: Acta Biol. Belg. **2**, 202 (1942). Ref. Kongr.zbl. **114**, 673. — Hahn, Bale u. Whipple: Zit. nach Gillman u. Jvy. — Heilig u. Hoff: Klin. Wschr. **1925 II**, 2194. — Heilmeyer, Keiderling u. Stüwe: Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe. Jena 1941. — Heilmeyer u. Koch: Dtsch. Arch. klin. Med. **185**, 89 (1939). — Heilmeyer u. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena 1937.— Heim: Ärztl. Wschr. **1948**, 326. — Hess: Klin. Wschr. **1933 I**, 129. — Hoff: Unspezifische und natürliche Abwehrvorgänge. Springer 1930. — Erg. inn. Med. **46** (1934). — Dtsch. med. Wschr. **1941 I**, 417. — Holmquist: Skand. Arch. Physiol. (D.) **65**, 18 (1933). — Jores: Erg. inn. Med. **48**, 574 (1935). — Dtsch. med. Wschr. **1938 I**, 737; **1938 II**, 989. — Leichtenstern: Zit. Bürker, Hand-

buch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. VI/1, S. 30. 1924. — Lintzel: Erg. Physiol. **31**, 844 (1931). — Menzel: Erg. inn. Med. **61**, 1 (1941). — Neue Deutsche Klinik, Erg.-Bd. 8, S. 406. 1944. — Ärztl. Wschr. **1947**, 705. — Merz: Diss. Lausanne 1942. Zit. Vanotti u. Delachaux, Der Eisenstoffwechsel und seine klinische Bedeutung. Basel 1942. — Mies: Z. inn. Med. **2**, 520 (1947). Müller, L. R.: Lebensnerven und Lebenstriebe. Berlin 1931. — Nitsch: Noch unveröffentlicht. — Oliva et Furbetta: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **17**, 249 (1942). Ref. Ber. Physiol. **131**, 543. — Reinert: Zit. Menzel. — Sakamoto: Kumatomo, med. Soc. (Jap.) **12** (1936). Zit. nach Beer. — Schäfer: Z. exper. Med. **110**, 679, 697, 713 (1942). — Mschr. Kinderhk. **96**, 18, 210 (1948). — Schmidt, M. B.: Erg. Path. **35**, 105 (1940). — Skouge: Klinische und experimentelle Untersuchungen über das Serumeisen. Oslo 1939. — Storm van Leuwen: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV, 7 B. — Straub u. Stefansson: Arch. exper. Path. (D.) **194**, 269 (1940). — Thoenes u. Aschaffenburg: Beih. Jb. Kinderhk. **1934**, H. 35. — Vahlquist: Acta paediatr. (Schwd.) **28**, Suppl. V (1941). — Extrait des Journees therapeutiques de Paris. 1946. — Diskussionsbemerkung. Verh. dtsch. Ges. Kinderhk. Göttingen 1948. Ref. Mschr. Kinderhk. (im Druck). — Völker: Pflügers Arch. **215**, 43 (1927). — Warburg: Biochem. Z. **187**, 255 (1927). — Warburg u. Krebs: Biochem. Z. **190**, 143 (1927). — Wetzel: Z. exper. Med. **111**, 320 (1943). — Wilke u. Conrath: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **203**, 178 (1944).

Prof. Dr. Karl-Heinz Schäfer, (20b) Göttingen, Univ.-Kinderklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 688—695 (1949).

Aus der Forschungsabteilung
der Knoll AG., Chemische Fabriken, Ludwigshafen a. Rh.

Tierexperimentelle Untersuchungen mit einem Strychnindepotpräparat.

Von
Wilhelm Biehler und G. Hanisch †.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Oktober 1948.)

Bei seinen Versuchen, Strychnin in Öl zu deponieren, um eine wesentliche Verlängerung der Wirkungsdauer bei protrahierten Kollapszuständen zu erzielen, hatte Fritz Schneider[1] eine beträchtliche Entgiftung dieses Mittels beobachtet.

Diese Beobachtung konnte in eigenen Versuchen weitgehend bestätigt werden. Es verhielten sich z. B. hinsichtlich der Toxizität (DL 50) an der weißen Maus Strychnin nitr. wäßrig zu Strychnin in Öl kalt gelöst zu Strychnin in Öl gelöst und 70 Std erhitzt wie = 0,9 mg/kg : 3 mg/kg : 13 mg/kg oder wie = 1 : 3,3 : 15.

Tabelle 1.

Zahl der Präparate	Lea-Zahl	Mittlere Toxizität mg/g Maus
6	1,8	5
6	3,9	6
9	6,5	13

Wie Abb. 1 * zeigt, führen 1 oder 2 mg Strychnin nitr. wäßrig zu einer kurzen explosionsartigen Wirkung auf die Reflexerregbarkeit der weißen Ratte (Kurve III) — 10 mg in Öl kalt gelöst zu einer längerdauernden, aber tödlichen Wirkung (Kurve I) — 10 mg in Öl und erhitzt dagegen zu einer über 7 Std anhaltenden gleichmäßigen Erregbarkeitssteigerung (Kurve II). Dies zeigt, daß die „Entgiftung" nicht nur durch eine Zerstörung des Strychnins bedingt sein kann.

In ausgedehnten Versuchsreihen konnte weiter gefunden werden, daß diese Entgiftung etwa proportional ging der Lea-Zahl der verwendeten Öle, also ihrem Gehalt an Peroxyden.

Damit war die Erklärung des Entgiftungsmechanismus als einer Oxydation des Strychnins nahegelegt und tatsächlich konnte als Oxydationsprodukt das N-Oxyd des Strychnins chemisch nachgewiesen und isoliert werden. Dieses Strychninoxyd wirkt gleichsinnig wie Strychnin

* Abgesehen von diesem Beleg sind unsere Original-Protokolle und Kurven durch Kriegseinwirkung zerstört.

selbst, ist aber etwa 30 mal weniger giftig, so daß hierdurch die Beobachtungen Schneiders ihre Erklärung finden.

In Tabelle 2 ist die subkutane mittlere tödliche Dosis (DL 50) in Milligramm je Kilo weiße Maus wiedergegeben, d. h. diejenige Giftmenge, bei deren subkutaner Verabreichung 50% der damit behandelten Tiere zugrunde gehen. Obwohl darauf geachtet wurde, daß sich unter den

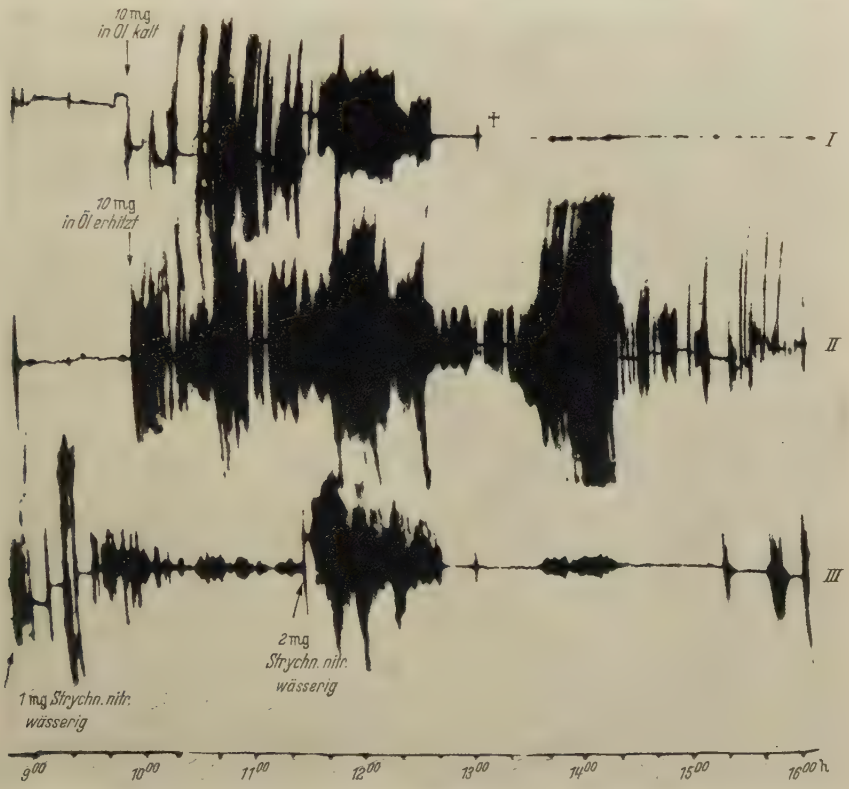


Abb. 1. Erläuterung zum Text.

Tieren keine untergewichtigen jungen Tiere befanden, da diese bekanntlich gegen Strychnin wesentlich empfindlicher sind als ausgewachsene, mußten doch gewisse Unterschiede in der Empfindlichkeit von Tieren verschiedener Herkunft in Kauf genommen werden. Die Werte schwankten also bei wiederholten Bestimmungen in gewissen Grenzen (Tabelle 2).

Nach Aufklärung des von Fritz Schneider beobachteten Entgiftungsvorganges war die Möglichkeit gegeben durch Verwendung peroxydfreien Öles (oder von Wasser) und einer bestimmten Mischung von Strychnin mit Strychninoxyd ein stabiles Mittel bestimmter und

konstanter Wirkungsstärke in die Hand zu bekommen. Die meisten Versuche wurden mit öligen Mischungen durchgeführt — in den Handel eingeführt wurde schließlich unter der Bezeichnung „Invocan forte" ein wäßriges Präparat, nachdem sich herausgestellt hatte, daß seine Wirkungsdauer nur wenig der des öligen nachstand*, während es die bekannten Vorzüge wäßriger Präparate, der leichteren und saubereren Handhabung, aufwies; 1 cm³ Invocan forte enthält 0,005 g Strychnin und 0,05 g Strychninoxyd als Laktate in wäßriger Lösung.

Tabelle 2. *Mittlere tödliche Dosis (DL 50) für die weiße Maus.*

	Strychnin mg	Strychninoxyd mg
Wäßrig	0,55—0,80	24,5—36,0
In Öl	2,5—6,5	41,5

Auch für die so gewonnenen Präparate konnten wir unter Ausnützung des Startreflexes der Ratte eine sehr lange Wirkungsdauer nachweisen (Protokolle und Aktogramme verloren).

Daneben wurde ein anderer Weg eingeschlagen, um über Ausmaß und Tempo der Resorption des Depots Aufschluß zu erhalten.

Unter Ausnutzung der Beobachtung, daß bei langsamer intravenöser Infusion einer wäßrigen Strychninlösung in die Schwanzvene der weißen Maus bei einer individuell nur wenig schwankenden Dosis stets ein tödlicher Streckkrampf des Tieres zu beobachten ist, wurde jeweils die Hälfte der mittleren subkutanen tödlichen Dosis des zu prüfenden Präparates subkutan injiziert und gewisse Zeitabstände nach dieser Verabreichung die „Auffülldosis" mit wäßriger Strychnin. nitr.-Lösung intravenös festgestellt. Subtrahiert man letztere Dosen vom Limes letalis, so lassen sich die erhaltenen Fußpunkte zu einer Kurve verbinden, welche ein anschauliches Bild von der im Körper noch aktiven Strychninmenge gibt. In den Abb. 2—4 sind auf der Abszisse die Zeit in Stunden, auf der Ordinate die erforderlichen Kubikzentimeter Auffüllösung (negativ) angegeben. Jeder Kurvenpunkt ist das Ergebnis der Messung an 20 Tieren. Abb. 2 zeigt die rasch vorübergehende Wirkung wäßriger Strychninlösung gegenüber der nur wenig nachhaltigeren Wirkung von Strychnin. nitr. in Öl gelöst; Abb. 3 zeigt das Gleiche für das ungiftigere und deshalb höher dosierbare Strychninoxyd. Dagegen sehen wir in Abb. 4 deutlich die wesentlich länger dauernde Wirkung einer Mischung von Strychnin mit Strychninoxyd (im Verhältnis 1:8) gegenüber der äquitoxischen Menge Strychnin. nitr. in Wasser.

* Weil nämlich hier das Strychninoxyd an Stelle des Öles Depotträger für das Strychnin ist.

Selbstverständlich läßt ein so lange wirkendes Heilmittel die Furcht vor Kumulationsschäden wachwerden. Diese Frage wurde zunächst im Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg geprüft. In Versuchen an Meerschweinchen und Katzen wurde beobachtet, daß das Depotpräparat „das typische Bild der Strychninvergiftung" erzeugt, wenn es in genügend hoher Dosis

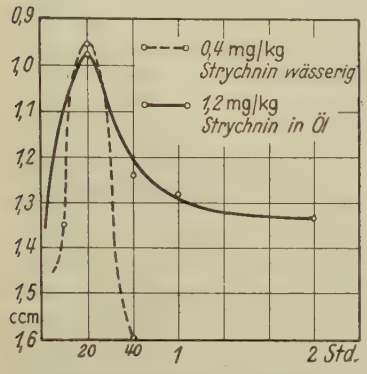


Abb. 2. Strychnin-Vergleich.

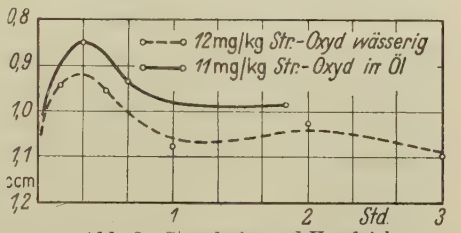


Abb. 3. Strychninoxyd-Vergleich.

gegeben wird. Wie gegen wäßrige Strychninlösung ist die Katze auch gegen das Ölpräparat erheblich empfindlicher als das Meerschweinchen. Für letzteres Tier wurde die Dosis letalis in wäßriger Lösung zu

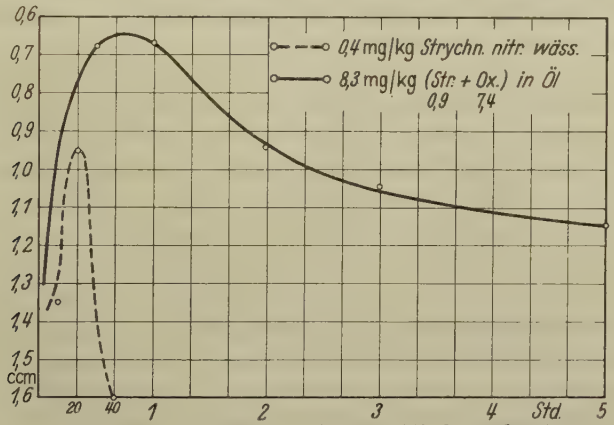


Abb. 4. Vergleich von Strychnin mit einem Mischungsdepotpräparat.

4 mg/kg, in der geprüften Depotform zu 40 mg/kg gefunden, was also einer 10fachen „Entgiftung" entspricht.

Wurde nun Meerschweinchen eine fast tödliche Dosis des Depotpräparates in Abständen von 24 Std injiziert, so ging das Tier nach der 3. oder 4. Injektion ein. Bei Injektion einer Gabe, die etwa $^3/_5$ der tödlichen entspricht, im Abstand von 9 Std, war ebenfalls die 3. oder 4. Injektion tödlich. — Wurde $^1/_3$ der tödlichen Dosis 3mal am Tage gespritzt, so trat am 2. bzw. 3. Tage der Tod unter Krämpfen ein.

Tabelle 3. *Versuchspräparat (Strychnin + Strychninoxyd 1:8) in Öl. (Dosis letalis media subkutan = 17 mg/kg weiße Ratte.)*

Dosis	Ratte	Zahl der werktäglichen Gaben	Ergebnis
9 mg/kg	weiß	29	tot
	scheck	59	lebt
	schwarz	59	lebt
6 mg/kg	200 g	59	lebt
	150 g	59	lebt
	160 g	28	getötet zur histologischen Untersuchung
1,7 mg/kg	170 g	55	tot
	170 g	59	lebt
	260 g	59	lebt
0,6 mg/kg	170 g	33	tot
	160 g	57	tot
	190 g	57	tot

Dieses Ergebnis wiederholter Verabreichung hoher Dosen des Strychnindepotpräparates zeigt eindeutig, daß seine Wirkung über die gewählten großen Zeitabstände hinaus andauert und die Wirkungsdauer des Strychnin nitr. in wäßriger Lösung um ein Vielfaches übertrifft.

Zu prüfen war nun ferner, ob eine echte Kumulation bei Dosen eintritt, die beim Tier den therapeutischen Dosen beim Menschen entsprechen. Bei dem damals benutzten öligen Depotpräparat waren 20 mg etwa 2 mg Strychnin. nitr. in Wasser wirkungsgleich. Die tödliche Strychnindosis für den Menschen wird mit 100—120 mg angegeben. Darauf fußend mußten also Versuche mit Gaben durchgeführt werden, welche $^1/_{50}$ bis $^1/_{60}$ der mittleren tödlichen Dosis entsprechen. Unter Einkalkulierung eines Sicherheitsfaktors konnte jedoch gezeigt werden, daß bei werktäglicher Verabreichung (in Abständen von 24 Std) von $^1/_{10}$, $^1/_3$ und sogar $^1/_2$ der DL weißen Ratten subkutan bis zu 59 Injektionen verabreicht werden konnten (Tabelle 3), ohne daß die Tiere irgendwelche Zeichen auch nur gesteigerter Erregbarkeit hätten erkennen lassen.

Daß die Todesfälle gleichmäßig über alle Dosierungen verteilt sind bzw. gerade bei der niedersten Gabe eine Häufung aufweisen, beweist, daß sie durch sekundäre Umstände bedingt sind und nicht dem Strychnindepotpräparat zur Last gelegt werden können. (Tatsächlich zeigten auch gerade die Tiere der niedrigsten Gruppe Verhärtungen an den Injektionsstellen, welche auf Infektion hinweisen.) Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei einer Versuchsdauer von 2 Monaten und werktäglicher Verabreichung selbst der halben tödlichen Dosis Anzeichen von Kumulation nicht zu beobachten waren.

Die Fortführung dieses Versuches ließ sogar eher auf eine gewisse Gewöhnung schließen. Nun wurden nämlich die Gaben, welche die Ratten vorher werktäglich erhalten hatten, stündlich verabreicht. Es vertrugen noch bis zur letalen Wirkung (Tabelle 4).

Tabelle 4. *(Dosis letalis media subkutan = 17mg/kg weiße Ratte.)*

Dosis	Ratte	Zahl der stündlichen Gaben
9 mg/kg	scheck	5 Injektionen
	schwarz	9 Injektionen
6 mg/kg	200 g	5 Injektionen
	150 g	8 Injektionen
1,7 mg/kg	170 g	8 Injektionen am 1. Tag
	260 g	an 3 Tagen je 9 Injektionen, am 5. Tag 5mal 8 mg/kg subkutan

Es ist bekannt, daß bei fieberhaften Zuständen wäßriges Strychnin weniger stark wirkt, also höher dosiert werden muß. (Bei dem Strychnindepotpräparat ist natürlich ebenso zu verfahren.) Zur Erklärung dieser Erscheinung ist daran zu erinnern, daß die im Fieber gesteigerte Oxydationstendenz des Organismus das Strychnin rascher als sonst über das Strychninoxyd entgiftet. Dementsprechend könnte andererseits das Überwiegen reduzierender Vorgänge (wie z. B. im Darmkanal, hauptsächlich seinen unteren Abschnitten) zu einem Ansteigen der Giftigkeit (durch Rückreduktion von Strychninoxyd zu Strychnin) führen.

Den Beweis für die Richtigkeit dieser Vermutung lieferten einige Selbstversuche mit oraler Einnahme des ausschließlich für parenterale Injektion gedachten Mittels. Wird 1 Ampulle Invocan forte einem Gesunden vorschriftsmäßig parenteral injiziert, so ist meist nur bei scharfer Beobachtung eine Erregbarkeitssteigerung bemerkbar; beim Kranken ist eine Tonisierung des Kreislaufs praktisch zu beobachten, die sich allerdings mehr in der Aufrechterhaltung normaler Werte und Vermeidung von Kollapsen als in Alterationen der Kreislaufwerte äußert. Dagegen zeigt die *orale* Verabreichung selbst kleinerer Gaben die ausgesprochenen Symptome einer Strychninvergiftung.

1. Dr. W. B. Etwa 15 Uhr während des Kaffeetrinkens $^1/_2$ Ampulle Invocan forte oral (2,5 mg Strychnin + 25 mg Strychninoxyd). Zunächst keinerlei Sensationen irgendwelcher Art. Als 1 Std später immer noch nichts zu bemerken ist, wird der Versuch wegen zu geringer Dosis als gescheitert angesehen. Abends etwa 19 Uhr leichtes Ziehen in der Kaumuskulatur. Beim späteren Entkleiden bereits deutliche Tendenz zu Streckvorgängen. Weiter bei bewußt ruhiger und gleichmäßiger Atmung blitzartige Streckungen des Körpers ohne erkennbaren Zusammenhang mit äußeren Reizen. Starkes Herzklopfen, lebhafte Darmtätigkeit. Der Versuch, eine Treppe hinabzusteigen, ist kaum möglich, da durch Überwiegen der Strecker die Beine immer wieder hochgestreckt werden. Gegen 2 Uhr früh langsames Abklingen der Erscheinungen, welche etwa um Mitternacht ihren Höhepunkt erreicht hatten.

2. Dr. W. D. 6^{15} Uhr: Orale Einnahme des Inhalts einer Invocanforte-Ampulle (1,1 cm^3) mit etwas Flüssigkeit nach einem Frühstück von etwa 200 g Brot und einigen Tassen (Ersatz)kaffees (5 mg Strychnin + 50 mg Strychnin-oxyd als Laktate in wäßriger Lösung). — 7^{30} Uhr: Auftreten von Erscheinungen wie nach übermäßigem Genuß von Kaffee (Druck auf den Schläfen, leichtes Kribbeln in den Fingern u. ä.). — 9^{00} Uhr: Allgemeines Unbehaglichkeits- und

Müdigkeitsgefühl wie nach einer durchfeierten Nacht mit Frösteln und Gähnen, ferner kalte Extremitäten und leichter Druck auf die Wadenmuskulatur, Puls 64, voll (normal um 65—70). — 10^{00} Uhr: Wie 9 Uhr, dazu beim Aufstehen leichtes Schwindelgefühl; Zunahme des Druckes auf die Wadenmuskulatur; etwas Druck auf die Kaumuskulatur; leichte Sprechbehinderung durch beginnende Zungensteifigkeit; zitteriges Schreiben, Puls 56, voll. — 11^{00} Uhr: Wie 10 Uhr; leichte Zunahme der Erscheinungen, Puls 52, voll. — 12^{30} Uhr. Nach dem Essen großes Steifigkeitsgefühl in den unteren Gliedmaßen sowie in der Kau-, Nacken- und Zungenmuskulatur, dazu roter Kopf. Das Gehen machte infolge von leichten Steifeerscheinungen anfangs große Schwierigkeiten. Die sonstigen unter 9 und 10 Uhr geschilderten allgemeinen Erscheinungen sind vergangen. — 13^{00} Uhr: Puls 68 (etwa 10 min nach einem $^1/_4$stündigen Gang). — 14^{30} Uhr: Fortbestand der Steifigkeitserscheinung; Puls 64, voll. — 15^{30} Uhr: Nachlassen der Erscheinungen; Puls 54, voll. — 16^{30} Uhr: Nur noch leichtes Steifigkeitsgefühl in den Ober- und Unterschenkeln; Puls 60, voll. — 16^{40} Uhr: Anfallsweise voller, aber schnell vorübergehender Streckkrampf der gesamten Beinmuskulatur beim Treppenhinabgehen mit anschließendem erheblichen Steifigkeitsgefühl von etwa 30 min; später keine Erscheinungen mehr.

Infolge leichter Verdauungsstörungen bis etwa 12 Uhr mehrmaliges Aufstoßen, das im Munde stets einen bitteren Geschmack hervorrief.

3. Dr. E. W. 1 cm^3 Invocan forte (5 mg Strychnin + 50 mg Strychninoxyd, Laktate, wäßrig) wurde um 7 Uhr morgens nüchtern eingenommen, anschließend ein kleines Frühstück, bestehend aus einer Scheibe Brot und einer Tasse schwarzen (Ersatz)kaffees. Nach etwa 1 Std traten Erscheinungen auf wie nach einer durchwachten Nacht; leichtes Frösteln, leichter Druck an den Schläfen und bereits beginnende Muskelsteifheit in den Beinen. Diese Erscheinungen nahmen laufend zu. Etwa um 10 Uhr dehnte sich diese Muskelsteifheit auch auf die Nackenmuskulatur aus. Um 11 Uhr war das Gehen nach dem Aufstehen vom Stuhl bereits stark erschwert, nach einigen Schritten besserte es sich. Um 11^{30} Uhr war fast die gesamte Muskulatur erfaßt, so daß leichte Sprechbehinderung zu verspüren war. Der Druck an den Schläfen dehnte sich auf den ganzen Kopf aus (Brummschädel). Um 12 Uhr erreichte die Muskelsteifheit ihren Höhepunkt, das Gehen war kaum mehr möglich. Das Mittagessen machte erhebliche Schwierigkeiten. Die Nackensteifheit hatte sich bis auf die Schultermuskulatur ausgedehnt. Die Schmerzen in den Schultern waren, wie nach stundenlangem Tragen eines bepackten Rucksackes. Leichtes Zittern am ganzen Körper, das gelegentlich zu angedeuteten Krämpfen führte. Dieser Zustand war insofern noch sehr unangenehm, als noch das ungewisse Gefühl dazukam, es könne in jedem Augenblick ein Krampf ausgelöst werden; es dauerte 2 volle Stunden an. Erst nach 2 Std gingen die einzelnen Erscheinungen langsam zurück; angefangen vom Zittern, der Nackensteifheit, dem abnehmenden Druck im Kopf. Das Gehen war um 16^{30} Uhr noch behindert; selbst beim Abendessen um 18 Uhr war die Steifheit der Kaumuskulatur noch nicht behoben. Erst um 19 Uhr machten diese geschilderten Symptome einer allgemeinen guten, leicht euphorischen Stimmung Platz.

Vor der *oralen Verabreichung* des Strychnindepotpräparates (Invocan forte) ist also zu *warnen*, obwohl der Tierversuch keinen diesbezüglichen Hinweis gibt:

Die Dosis letalis media von Invocan forte für die weiße Maus:

intravenös	(2,5 mg/kg Strychninoxyd + 0,25 mg/kg Strychnin)	als Laktate in wäßriger Lösung.
subkutan	(7,5 mg/kg Strychninoxyd + 0,75 mg/kg Strychnin)	
oral	(13,0 mg/kg Strychninoxyd + 1,30 mg/kg Strychnin)	

Auch die gleichzeitige Gabe reduzierend wirkender Mittel muß theoretisch zu einer Giftigkeitssteigerung führen.

In einer Versuchsreihe wurde die Toxizität von jeweils 30 mg/kg Strychninoxyd allein oder zusammen mit der gewichtsgleichen Menge Askorbinsäure an einem größeren Tiermaterial geprüft.

Tabelle 5.

Mittel	Tiere	Tot %
Strychninoxyd ohne Zusatz	40	45
Strychninoxyd + getrennt davon injiziert: Askorbinsäure āā	30	63
Mischung (Strychninoxyd + Askorbinsäure āā) . .	40	71

An einem anderen Tiermaterial ergab sich die mittlere tödliche Dosis für:

Strychninoxyd allein, wäßrig	zu 25 mg/kg
Strychninoxyd am Rücken subkutan + getrennt verabreicht am Bauch Askorbinsäure (gleiche Menge)	zu 20 mg/kg
Mischspritze (Strychninoxyd + Askorbinsäure āā) .	zu 15 mg/kg

Ob allerdings dieser Beobachtung praktischer Bedeutung für den Menschen (bezüglich gleichzeitiger therapeutischer Verwendung von Askorbinsäure und Invocan forte) zukommt, mag dahingestellt bleiben; der Unterschied der Dosen und der reagierenden Masse des Mäuse- bzw. Menschenkörpers ist doch zu bedeutend.

Von größerer praktischer Bedeutung dürfte die auch an unserem Tiermaterial beobachtete höhere Empfindlichkeit junger gegenüber älteren Individuen sein, auf welche deshalb hiermit nochmals hingewiesen sein soll.

Zusammenfassung.

Auf Grund eingehender Versuche mit Strychninoxyd und seiner Mischung mit Strychnin ließ sich ein Strychnindepotpräparat entwickeln, dessen lange und gleichmäßige Wirkung experimentell nachgewiesen wurde. Eine Kumulation ist bei Injektion therapeutischer Gaben und Einhaltung entsprechender zeitlicher Abstände nicht zu befürchten. Auf die Bedeutung oxydativ-reduktiver Vorgänge sowie des Lebensalters wird hingewiesen (Fieber, Darmkanal, Pädiatrie!)

Literatur.

[1] Schneider, Fritz: Wien. klin. Wschr. **1944**, 321.

Dr. Dr. W. Biehler, Ludwigshafen, Frankenthaler Straße 196.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 696—702 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Cholerese durch synthetische Mittel.

III. Mitteilung.

Wirkung und chemische Konstitution einiger Phenylkarbinol- und Phenylglykolverbindungen.

Von

WERNER KALOW.

(Eingegangen am 15. Februar 1949.)

Im Anschluß an die ersten beiden Mitteilungen[1] über die choleretische Wirkung von p-Tolylmethylkarbinol und von seinem Homologen Phenylmethylkarbinol wurde eine Reihe weiterer, chemisch ähnlicher Substanzen auf ihren galletreibenden Effekt untersucht, woraus sich unter anderem einige Aussagen über den Zusammenhang von Konstitution und Wirkung ergeben.

Methodisches.

Die angewandte Technik zur Messung der Cholerese von Ratten ist in der ersten Mitteilung geschildert. Als Lösungsmittel konnte nicht ausschließlich Paraffinum liquidum verwandt werden, wie es für Tolyl- und Phenylmethylkarbinol geeignet war. In einigen Fällen mußten die Choleretica vielmehr durch 0,25—0,3 cm^3 Isopropylalkohol gelöst werden. Diese Lösung wurde dann durch Paraffinöl auf 1 cm^3 aufgefüllt und durch kräftiges Schütteln in der Spritze fein emulgiert bzw. nicht ganz gelöste Teilchen suspendiert. 1 cm^3 dieser Mischung der Lösungsmittel allein, durch die Schlundsonde in den Magen oder durch eine Kanüle direkt ins Duodenum gegeben, hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Cholerese der Ratten, wie in 4 Vorversuchen festgestellt wurde. Einige Substanzen waren gut wasserlöslich. Soweit sie über den Darmkanal wirksam waren, wurde auch ihre venöse Anwendung geprüft. Zur Injektion wurde die Vena femoralis freigelegt.

Eine wichtige Fehlerquelle bei der Versuchsanordnung liegt in dem hohen Temperaturkoeffizienten der Gallensekretion. Praktisch ist die urethannarkotisierte Ratte völlig poikilotherm, so daß sich schon geringe Änderungen der Raumtemperatur auf die Rektaltemperatur auswirken. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} ist im Bereich von 24—32° rektal von der Größenordnung 3, erst bei 36° wird $Q_{10} = 1$, d. h. die Gallensekretion wird temperaturunabhängig. Bei weiterer Temperaturerhöhung erreicht der Koeffizient als Zeichen einer Schädigung der Ratte negative Werte. Die Mehrausscheidung an Galle durch die hier geprüften Choleretica scheint temperaturabhängig zu sein, jedenfalls wird der zeitliche Verlauf der Ausscheidungskurve stark beeinflußt.

Ergebnisse.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt. Sie enthält Angaben über die Wirkung von 2 Millionmol der 12 untersuchten Substanzen.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Cholerese weißer Ratten.* Dosis 2 Millimol/kg.

Substanz	Mol-Gewicht	Lösungsmittel	Anwendungsweise	Tropfenzahl vorher	Tropfenzahl nachher	Änderung %	Durchschnitt %
p-Äthylphenylmethylkarbinol	150	Paraffinum liquidum	oral	20	19	95	
			,,	21	22	104	113
			,,	10	14	140	
p-Tolylmethylkarbinol	136	,,	,,	14	18	128	
			,,	11	15	136	156
			,,	18	37	205	
Phenylmethylkarbinol	122	,,	,,	10	18	180	
			,,	23	41	178	177
			duodenal	26	45	173	
Phenyl-methyl-karbinol-Bernsteinsäureester**	244	Wasser	,,	16	32	200	
			,,	8	12	150	186
			i.v.*	14	29	207	
Phenylglykol	138	Wasser	oral	17	15	88	
			,,	12	16	133	107
			,,	14	14	100	
Phenylglykolessigester	180	Paraffinum liquidum	,,	14	12	86	
			,,	12	18	150	115
			,,	12	13	108	
Phenylglykolmethyläther	152	,,	,,	10	22	220	
			,,	32	51	159	177
			,,	19	29	153	
Phenylglykoläthyläther	166	,,	duodenal	21	40	190	
			oral	14	24	171	181
			,,	16	29	181	
Phenylglykol-β-phenyläther	214	Paraffinum liquidum + Isopropyl-alkohol	duodenal	22	38	173	
			,,	29	61	210	175
			,,	12	17	142	
Phenylglykol-α-phenyläther	214	,,	,,	10	12	120	
			,,	9	20	221	167
			,,	13	21	161	
Phenoxy-acetophenon	212	,,	,,	21	22	105	
			,,	46	62	135	122
			,,	15	19	127	
Mandelsäurephenyläther	251	Wasser	,,	14	19	136	
			,,	12	13	108	128
			i.v.*	20	28	140	

Galletropfen je 30 min im Normalzustand (Spalte 5) und zur Zeit der stärksten medikamentösen Wirkung (Spalte 6); Spalte 7: normale Cholerese 100%. — * Intravenös nur 1 Millimol/kg. — ** Als Natriumsalz.

Diese hohe Dosierung wurde für den Vergleich gewählt, um auch schwächer wirksame Verbindungen zu erfassen. Beim Menschen dürften 20—30fach niedrigere Dosen ausreichen, wenn man die klinischen Erfahrungen mit Synthobilin, dem kampfersauren p-Tolylmethylkarbinol, der Schätzung zugrunde legt[9]. Diese Differenz zwischen Klinik und Tierversuch liegt nur zum Teil an der willkürlich hohen Wahl der Dosis für die Ratten. Das Fehlen von Galle im Rattendarm, die nach außen abgeleitet wird, wirkt sich stark auf die Löslichkeit der Choleretika und damit sicher auch auf deren Resorption aus. Denn schon im orientierenden Versuch in vitro läßt sich leicht nachweisen, daß Galle die Auflösung der Substanzen sehr erleichtert. Nur bei intravenöser Injektion der Choleretika und bei Erwärmung der Ratten auf 36° ist auch bei der Ratte die choleretische Wirkung in ähnlicher Dosierung wie in der Klinik meßbar.

Die für Phenylmethylkarbinol, Phenylglykol-β-phenyläther und Phenoxy-acetophenon angegebenen Wirkungswerte entstammen einer Anzahl von Messungen in gleicher Dosierung und geben somit ein durchschnittliches Bild. Diese Zahlen haben also besonderes Gewicht. Prüfungen mit niedrigerer Dosis wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. Für Phenylmethylkarbinol sind derartige Versuche bereits in der I. Mitteilung beschrieben. Phenylglykolmethyläther hatte ebenfalls schon in viel geringerer Dosis als 2 Millimol/kg eine Wirkung, z. B. steigerten 0,05 Millimol/kg das sind 7,5 mg/kg, die Galleproduktion um 40%. 0,2 Millimol/kg Phenylglykol-β-phenyläther (43 mg/kg) steigerten die Cholerese um 25%. Dabei handelte es sich um intraduodenale Gaben. Bei intravenöser Injektion des wasserlöslichen Natriumsalzes vom Phenylmethylkarbinol-Bernsteinsäureester z. B. steigerte 0,1 Millimol/kg = 24,4 mg/kg die Zahl der Galletropfen in der Zeiteinheit um 50%. Diese und 19 weitere Untersuchungen mit dazwischenliegenden Dosen stützen also die Angaben der Tabelle; das ist insofern von Bedeutung, als der Durchschnitt aus 3 Versuchen, wie sie jeweils tabelliert sind, mit einem erheblichen mittleren Fehler behaftet ist.

Einige spezielle Untersuchungen wurden durchgeführt, um zwischen Phenylmethylkarbinol und Tolylmethylkarbinol zu unterscheiden. Ausschließlich zu diesem Zweck wurde eine kleine Menge Tolylmethylkarbinol-Bernsteinsäureester hergestellt und mit dem entsprechenden Phenylmethylkarbinolester bei intravenöser Injektion am selben Tier verglichen. Bei 2 Ratten wurde Phenylmethylkarbinol zuerst injiziert, bei 2 anderen Ratten Tolylmethylkarbinol. Die Ergebnisse zeigten, daß der Wirkungsunterschied zwischen beiden Verbindungen nicht so groß ist, wie man nach den Versuchen mit oraler Aufnahme annehmen könnte.

Eines der Präparate aus der Phenylglykolreihe, nämlich der β-Phenyläther, wurde zum besseren Vergleich mit Phenylmethylkarbinol (I. Mitteilung) noch etwas näher untersucht. Wie dort fand ich auch hier einen Verdünnungseffekt. Denn nach 2 Millimol/kg Phenylglykol-β-Phenyläther stieg die Anzahl der in 30 min ausgeschiedenen Galletropfen durchschnittlich um 75%, während das Trockengewicht im

gleichen Zeitraum einmal von 5,2 auf 6,1 mg, ein andermal von 7,2 auf 8,6 mg stieg, also um etwa 18%. Die Verdünnung der Galle trotz der vermehrten Ausscheidung fester Bestandteile war demnach noch ausgeprägter als nach Phenylmethylkarbinol.

Die Giftigkeit des Phenylglykol-β-phenyläthers ist außerordentlich gering und auch dem Phenylmethylkarbinol vergleichbar. Einen Monat lang wurden 5 jüngeren, männlichen weißen Ratten 1 g/kg unter das Futter gemischt. Dieses bestand aus Weichfutter und wurde so bemessen, daß es immer aufgefressen wurde. Die Tiere verhielten sich stets normal und gediehen gut. Sie nahmen durchschnittlich um 50 g zu. Bei der Sektion der Ratten zu Ende des Versuches erschien kein Organ krankhaft verändert. Leber und Nieren wurden histologisch untersucht. Nur in einer Leber zeigte sich ein kleiner nekrotischer Herd in Abheilung, der sehr wahrscheinlich einen Zufallsbefund darstellte, und dem daher keine besondere Bedeutung zugemessen wurde*.

Chemische Konstitution und Wirkung.

Zur Erörterung des Zusammenhanges zwischen chemischer Konstitution und Wirkung können außer den eigenen auch Versuche anderer Autoren herangezogen werden. Vor allem hat Fromherz[3] eine Reihe ähnlicher Substanzen geprüft und gefunden, daß viele Aryl-Alkylkarbinole choleretisch wirksam sind. Nach den vorliegenden Untersuchungen läßt sich diese Aussage etwas präzisieren. Denn das einfache Phenylmethylkarbinol hatte einen besonders starken Effekt, aber die Wirksamkeit schien nach den vorliegenden Ergebnissen abzunehmen, wenn der Ring in p-Stellung mit Kohlenwasserstoffen substituiert war. So schien das Tolylmethylkarbinol, das wegen seines natürlichen Vorkommens in der Curcumadroge den Ausgangspunkt für die Untersuchungsreihe bildete, bereits ein wenig schwächer** zu sein, das Äthylphenylmethylkarbinol war viel schwächer wirksam (vgl. die Formeltafel).

Nach den Untersuchungen von Fromherz[3] spielte es keine Rolle, ob am hydroxyltragenden C-Atom ein oder zwei Substitutionen vorgenommen werden, ob also eine sekundäre oder tertiäre Alkoholgruppe vorliegt.

Eine Veresterung des Karbinolhydroxyls mit Dikarbonsäuren zu dem Zweck, wasserlösliche Verbindungen zu erhalten, änderte die Wirksamkeit kaum. Stets war dabei nur eine Karboxylgruppe an der Esterbildung beteiligt, die andere blieb zur Bildung eines Natriumsalzes frei.

---

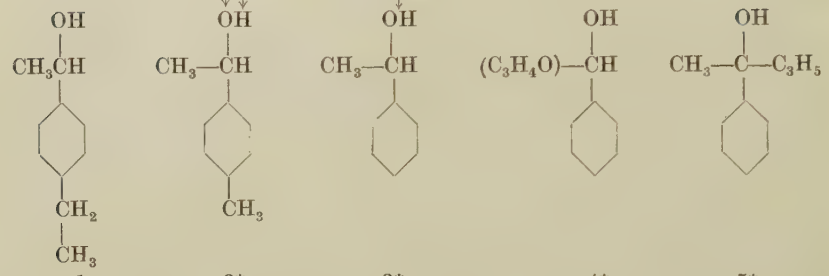
* Die histologischen Präparate wurden von Herrn Prof. Rössle untersucht und beurteilt, wofür ich ihm herzlich danke.

** Möglicherweise unterscheidet sich das natürliche Tolylmethylkarbinol vom synthetischen Präparat wegen des asymmetrischen C-Atoms im Molekül durch optische Aktivität und damit vielleicht auch durch größere Wirksamkeit.

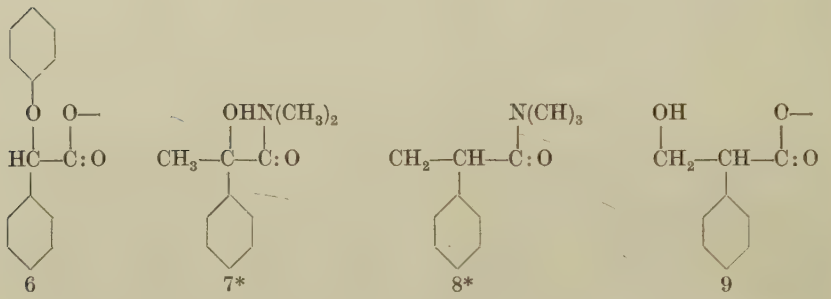
Formeltafel.

Auch als Ester

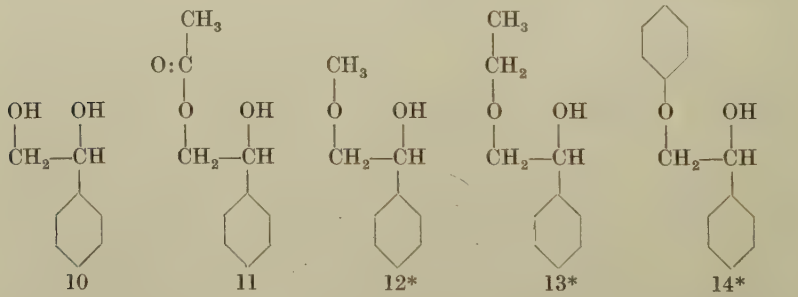
Phthalsäure + Bernsteinsäure +
Kamphersäure +



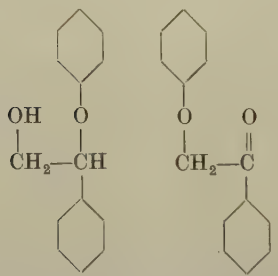
1 2* 3* 4* 5*



6 7* 8* 9



10 11 12* 13* 14*



15* 16

1. p-Äthyl-phenylmethylkarbinol
2. p-Tolylmethylkarbinol
3. Phenylmethylkarbinol
4. Phenyl-acetonyl-karbinol
5. Phenylmethylallylkarbinol
6. Phenylester der Mandelsäure
7. Atrolactinsäure-dimethylamid
8. Tropasäure-dimethylamid
9. Tropasäure
10. Phenylglykol
11. Phenylglykol-Essigsäureester
12. Phenylglykol-methyläther
13. Phenylglykol-äthyläther
14. Phenylglykol-β-phenyläther
15. Phenylglykol-α-phenyläther
16. Phenylglykol-acetophenon

Die mit einem * versehenen Substanzen wirken stark choleretisch.

Das gilt für den Phenyl-methylkarbinol-Bernsteinsäureester wie auch für die Kampfersäure- und Pthalsäureester des Tolylmethylkarbinols, die von SCHOENE[4] beschrieben wurden. Auch in der Phenylglykolreihe schien die Esterbindung keinen wesentlichen Einfluß auf den choleretischen Effekt zu nehmen. Denn die Wirkungslosigkeit des Phenylglykols wurde durch Veresterung mit Essigsäure kaum geändert.

Dagegen waren Phenylglykol*äther* sehr wirksam. Beim Phenylglykolphenyläther, der als feste Substanz vorlag, konnten die α- und β-Äther vollständig getrennt werden. Sie waren in ihrer Wirkung kaum zu unterscheiden. Bei den übrigen flüssigen Äthern hat ein Gemisch beider Isomeren vorgelegen.

Vom Phenylglykol-β-phenyläther unterscheidet sich das Phenoxyacetophenon nur durch eine Ketogruppe an Stelle der freien Hydroxylgruppe. Trotzdem führte auch diese Änderung zu einer erheblichen Minderung der Wirkung. Verbindungen, bei denen die Hydroxylgruppe am α-C-Atom durch Wasserstoff ersetzt ist, hat HILDEBRANDT in unveröffentlichten Arbeiten untersucht, wie KOHLSTÄDT[5] in seiner Übersichtsarbeit erwähnt. Es handelt sich um p-Xylylkarbinole, die als nicht so wirksam wie Tolylmethylkarbinol bezeichnet werden.

Chemisch verwandt mit den hier untersuchten Verbindungen ist eine Reihe aromatischer Säuren. So überrascht es nicht, daß dem Mandelsäurephenyläther eine choleretische Wirksamkeit zukommt. Nach FROMHERZ[3] hat auch das Dimethylamid der Tropasäure und der Atrolaktinsäure einen gleichartigen Effekt, während die freie Tropasäure wirkungslos ist. Bemerkt sei, daß, wie bei den oben erwähnten Xylylkarbinolen, auch bei Tropasäuredimethylamid kein Sauerstoff an das phenylsubstituierte C-Atom gebunden ist. Daraus geht hervor, daß das Vorhandensein eines O_2-haltigen Restes an dieser Stelle keine absolute Bedingung für eine choleretische Wirksamkeit ist.

Vielleicht ist durch die zuletzt genannten Säuren der pharmakologische Zusammenhang mit einer anderen Gruppe aromatischer Säuren gegeben, die auch choleretisch wirken, und deren bekanntester (wenn auch in dieser Hinsicht nicht wirksamster) Vertreter die Salizylsäure ist. Eine Übersicht über 27 Säuren der aromatischen Reihe und ihren Einfluß auf die Galleproduktion von Hunden stammt von CHABROL und Mitarbeitern[6].

Es gibt also verschiedene Serien aromatischer Körper (außer einer großen Zahl hydroaromatischer Verbindungen, Terpene usw.), die die Gallesekretion fördern. Innerhalb dieser einzelnen Serien bestehen Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung, während zwischen den einzelnen Serien wenig chemische Verwandtschaft zu erkennen ist. Ob sich der Wirkungsmechanismus dieser Choleretika in der Leber unterscheidet, was vielleicht nur in manchen Fällen durch Unterschiede in

der Zusammensetzung der vermehrt geförderten Galle angezeigt wird (vgl. [1, 4]), muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung.

Der choleretische Effekt von 12 verschiedenen Phenylkarbinol- und Phenylglykolverbindungen wurde an der Ratte geprüft. Als besonders wirksam erwiesen sich Phenylmethylkarbinol und sein Bernsteinsäureester, sowie eine Reihe von Äthern des Phenylglykols. Die nach Anwendung des β-Phenyläthers ausgeschiedene Galle ist etwas verdünnt. Die Giftigkeit dieser Verbindung ist sehr gering.

Zwischen der chemischen Konstitution und Wirkung ergaben sich folgende Beziehungen:

1. Kohlenwasserstoffketten in p-Stellung vermindern den Effekt.
2. Eine Veresterung der Hydroxylgruppe hat weder einen fördernden noch hemmenden Einfluß auf die Cholerese.
3. Eine Ätherbindung macht das Phenylglykol zu einem wirksamen Präparat.

Im methodischen Teil wurde der Einfluß der Temperatur auf die Rattencholerese geschildert.

Alle hier untersuchten Substanzen wurden mir von der Firma Riedel-de Haen, Berlin. durch Herrn Dr. Boedecker zur Verfügung gestellt, wofür ich an dieser Stelle herzlich danke.

Literatur.

[1] Kalow, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 35, 43 (1949). — [2] Kalk, H.: Dtsch. med. Wschr. **1942**, 502. — [3] Fromherz, K.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 571 (1942). — [4] Schoene, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 372 (1938). [5] Kohlstaedt, E.: Pharmazie **2**, 529 (1947). — [6] Chabrol, E., R. Charonnat, M. Maximim, J. Porin et M. E. Piettre: Presse med. **38**, 438 (1930).

Dr. Werner Kalow, Berlin, Garystr. 9,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 703–710 (1949).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

Die Wirkung des Xanthins und mehrerer methylierter Xanthinderivate auf die Aktivität der spezifischen Cholinesterase und Aminoxydase.

Von

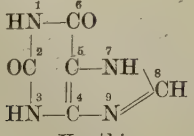
Fritz Heim und R. Reim.

Mit 5 Textabbildungen.

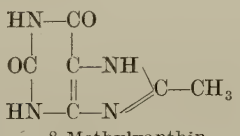
(Eingegangen am 25. Juni 1949.)

In einer früheren Arbeit[1] wurde mitgeteilt, daß die cholinesterasehemmende Wirkung des Physostigmin, Kokain, Pantocain, Tutocain und Novocain nicht nur an das Vorhandensein der Esterbindungen, sondern auch einer alkylierten Stickstoffgruppe im phenolischen bzw. alkoholischen Anteil des Moleküls geknüpft ist. Eine weitere Voraussetzung scheint das Vorhandensein einer alkylierten Aminogruppe im Säureanteil dieser Ester zu bilden. Man darf nach Hanske[2] annehmen, daß diese N-alkylierten Gruppen zum Zustandekommen der Bindung an das Fermentmolekül notwendig sind.

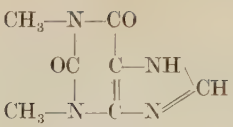
Die spezifische Cholinesterase, die sich vor allem in Erythrozyten und im Zentralnervensystem, doch auch in der Muskulatur und anderen inneren Organen findet, unterscheidet sich nach Zeller und Bissegger[3], Nachmansohn und Schneemann[4] von der unspezifischen Serumesterase unter anderem darin, daß sie durch Koffein spezifisch gehemmt wird. Koffein ist Trimethyl-dioxy-purin. Dioxypurin ist das Xanthin, das man sich als aus einem Pyrimidin- und Imidazolring zusammengesetzt vorstellen kann, wenn auch die wirkliche Synthese andere Wege geht. Bei der großen Bedeutung, die den alkylierten N-Gruppen für die cholinesterasehemmende Wirkung zukommt, haben wir zur weiteren Klärung der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und fermentemmender Wirkung Xanthin und mehrere seiner methyl-substituierten Derivate auf ihre Hemmungswirkung gegenüber der spezifischen Cholinesterase aus Erythrozyten und Gehirn untersucht. Die Konstitutionsformeln der uns zur Verfügung stehenden untersuchten Substanzen sind in der Formeltabelle zusammengestellt.

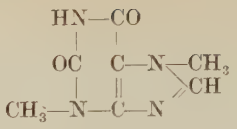


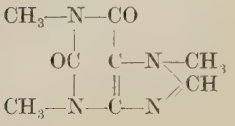
Xanthin

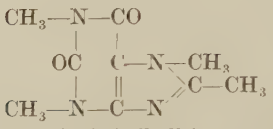


8-Methylxanthin


Theophyllin


Theobromin


Koffein


8-Methylkoffein

Methodik. Sie entspricht im wesentlichen der in einer früheren Arbeit[1] angegebenen. Da sich die von uns untersuchten Körper in Krebs-Ringerlösung nicht genügend lösen, wurden sie in der zu den Versuchen benötigten Menge von 0,01 mMol in 1,0 cm³ 0,027 n Natronlauge zur Lösung gebracht. Der einzelne Versuchsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: Im Hauptstück der Warburgkölbchen befanden sich 4,0 cm³ fermenthaltige Krebs-Ringerlösung + die in 1,0 cm³ 0,027 nNaOH gelöste zu untersuchende Substanz. Im Ansatzstück befanden sich 0,03 mMol Acetylcholinhydrochlorid in 1,0 cm³ Krebs-Ringerlösung gelöst. Der Gesamtinhalt der Kölbchen betrug somit 6,0 cm³.

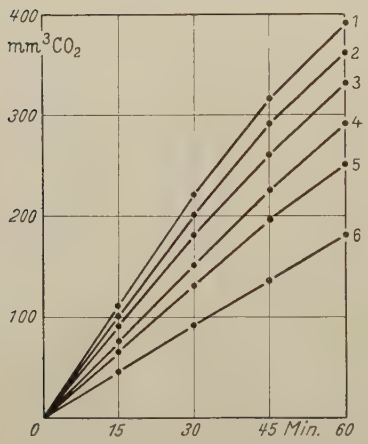


Abb. 1. Kurve 1: Zeitlicher Verlauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 mMol Acetylcholinhydrochlorid durch 0,15 cm³ Erythrozytenhämolysat. Kurve 2: In Gegenwart von 0,01 mMol Xanthin; Kurve 3: In Gegenwart von 0,01 mMol Theophyllin; Kurve 4: In Gegenwart von 0,01 mMol Koffein; Kurve 5: In Gegenwart von 0,01 mMol Theobromin; Kurve 6: In Gegenwart von 0,01 mMol 8-Methylkoffein.

In Abb. 1 wurde der Einfluß der genannten Substanzen auf die fermentative Hydrolyse von Azetylcholin durch 0,15 cm³ hämolysierte Erythrozyten kurvenmäßig dargestellt. Die Kurven geben die Mittelwerte aus je 8 Einzelversuchen wieder. Die prozentuale Hemmung betrug 30 min nach Versuchsbeginn für Xanthin 9%, für das 8-Methylxanthin, das der Übersicht halber in Abb. 1 weggelassen wurde, 6%, für Theophyllin 18%, Theobromin 38%, Koffein 30% und 8-Methylkoffein 58%. Es wurde weiterhin der Einfluß des Xanthins und seiner Methylderivate auf die Aktivität der Cholinesterase des Gehirns von Katzen und Ratten untersucht. Abb. 2 gibt die Mittelwerte aus je 8 derartigen Versuchen mit Katzenhirn wieder. Die Ergebnisse mit

Rattenhirnsuspension entsprechen diesen Versuchen, jedenfalls in qualitativer Hinsicht, ganz. Die prozentuale Hemmung 30 min nach Versuchsbeginn beträgt bei den Versuchen mit Katzenhirn für das Xanthin 5%. 8-Methylxanthin 7%, Theophyllin 8%, Theobromin 32,5%, Koffein 31% und 8-Methylkoffein 52%. Die Cholinesterase sowohl aus Erythrozyten als auch aus Gehirn wird also in zunehmendem Maße in der Reihenfolge Xanthin — Methylxanthin — Theophyllin — Koffein — Theobromin — Methylkoffein gehemmt. Vergleichen wir die untersuchten Körper hinsichtlich der Beziehungen zwischen Hemmungswirkung und chemischem Aufbau untereinander, so fällt auf, daß der Einfluß des alkylfreien Xanthins und des an einem C-Atom methylierten 8-Methylxanthins sehr gering ist. Doch auch das an den beiden N-Atomen des Pyrimidinrings methylierte Theophyllin hemmt nur schwach. Stärker dagegen ist die Inhibitorwirkung des gleichzeitig an der sekundären Stickstoffgruppe des Imidazolrings methylierten Koffeins. Etwas stärker als Koffein hemmt das 3,7-methylierte Theobromin. Die weitaus stärkste Hemmungswirkung besitzt das 8-Methylkoffein. Hier trägt der Imidazolring zwei benachbarte Alkylgruppen. Es kommt also hinsichtlich des Grades der Inhibitorwirkung, wie wir sehen, nicht allein auf die Zahl, sondern auch auf die Stellung der Alkylgruppen im Molekül an, und zwar scheint eine N-Alkylierung des Pyrimidinrings — wie beim Theophyllin — die Hemmungswirkung des Xanthins wenig zu verstärken. Wesentlicher für den Hemmungsvorgang scheint die Alkylierung an N 7 des Imidazolrings zu sein. Die stärkste Wirkung erreicht man mit dem 1-, 3-, 7-, 8-Methylxanthin (8-Metylkoffein), bei dem zur N-Alkylierung noch eine Methylgruppe an das 8-Kohlenstoffatom des Imidazolrings hinzutritt. Es wird deshalb zur Unterscheidung zwischen unspezifischer Esterase und spezifischer Cholinesterase auf Grund unserer Beobachtungen an Stelle des Koffeins besser das 8-Methylkoffein zu verwenden sein, da seine Hemmungswirkung fast

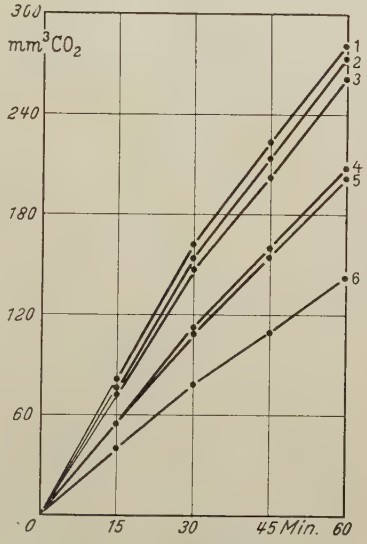
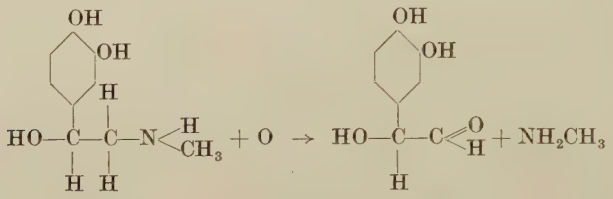


Abb. 2. Kurve 1: Zeitlicher Verlauf der fermentativen Hydrolyse von 0,03 mMol Acetylcholinhydrochlorid durch 0,2 g Katzenhirn; Kurve 2: In Gegenwart von 0,01 mMol Xanthin; Kurve 3: In Gegenwart von 0,01 mMol Theophyllin; Kurve 4: In Gegenwart von 0,01 mMol Koffein; Kurve 5: In Gegenwart von 0,01 mMol Theobromin; Kurve 6: In Gegenwart von 0,01 mMol 8-Methylkoffein.

das Doppelte des Koffeins beträgt. Auf die acetylcholinspaltenden Fermente des Serums und des Darms sind Xanthin und die von uns untersuchten Methylderivate nach unseren Beobachtungen ohne Wirkung.

Weiterhin wurde der Einfluß des Xanthins und seiner Methylderivate auf die Aktivität der Aminoxydase aus Leber und Niere von Meerschweinchen untersucht. Unter Einwirkung dieses Ferments werden Adrenalin, Tyramin, Sympatol und andere aromatische Amine desaminiert und gleichzeitig zu entsprechenden Aldehyden oxydiert nach folgendem Schema:



Methodik. Meerschweinchenleber bzw. -niere werden mit Quarzsand verrieben, mit m/7,5 Phosphatpuffer von p_H = 7,3 im Verhältnis 1 : 10 extrahiert und die korpuskulären Bestandteile abzentrifugiert. Die Sauerstoffverbrauchsmessung erfolgt in der Warburgapparatur in reiner Sauerstoffatmosphäre bei 35° C. Es wird die zur Oxydation des Adrenalins, bzw. Tyramins in der Zeiteinheit verbrauchte O_2-Menge bestimmt. Der einzelne Versuchsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen: Im Hauptstück der Kölbchen: 3,5 cm³ Phosphatpuffer-Organextrakt + 1 mg NaCN zur Hemmung schwermetallhaltiger Oxydasen + die in 1,0 cm³ 0,027 n NaOH gelöste zu untersuchende Substanz. Im Ansatzstück befinden sich in 1 cm³ H_2O gelöst 0,02 mMol Adrenalinhydrochlorid bzw. Tyraminhydrochlorid. Im Einsatz 0,25 cm³ 7% KOH zur Absorption eventuell entstehender Kohlensäure. Wie wir durch Kontrollversuche feststellen konnten, unterbleibt in durch Hitze inaktivierten Leber- und Nierenextrakten unter den von uns angewandten Versuchsbedingungen eine mit Verbrauch von molekularem Sauerstoff einhergehende Spontanoxydation des Adrenalins bzw. Tyramins. In den folgenden Abbildungen und Tabellen ist die Aktivität der Aminoxydase als Funktion der in der Zeiteinheit verbrauchten Kubikmillimeter O_2 dargestellt.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wird die fermentative Oxydation von Adrenalin durch Leberextrakt in Gegenwart von 0,01 mMol Xanthin überhaupt nicht, durch Theobromin nur sehr wenig gehemmt. Das 8-Methylkoffein hemmt schwach, während das Theophyllin und vor allem das Koffein die Aminoxydase in hohem Grade inaktivieren. Die prozentuale Hemmungswirkung beträgt 30 min nach Versuchsbeginn

für Xanthin 0%, 8-Methylxanthin 1,5%, Theophyllin 34%, Theobromin 2%, Koffein 50% und Methylkoffein 10%.

Betrachten wir in Abb. 4 den Einfluß dieser Körper auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation des Adrenalins durch die

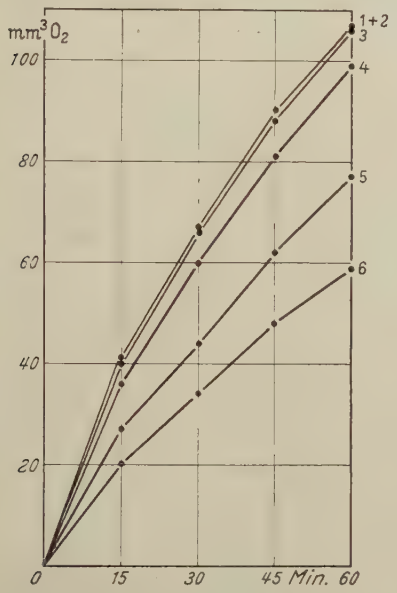


Abb. 3. Kurve 1: O_2-Verbrauch bei der fermentativen Oxydation von 0,02 mMol Adrenalinhydrochlorid durch 3,5 cm³ Phosphatpuffer-Meerschweinchenleberextrakt 1:10 in Gegenwart von 1 mg NaCN; Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Xanthin; Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Theobromin; Kurve 4: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol 8-Methylkoffein; Kurve 5: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Theophyllin; Kurve 6: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Koffein.

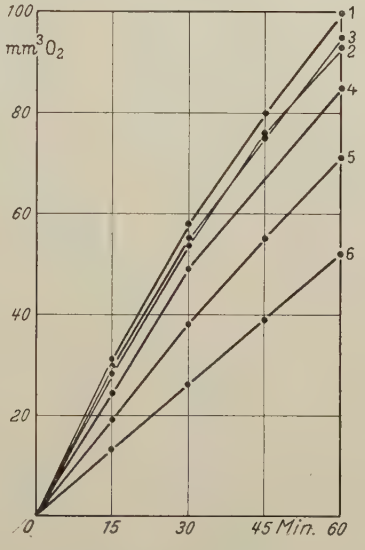


Abb. 4. Kurve 1: O_2-Verbrauch bei der fermentativen Oxydation von 0,02 mMol Adrenalinhydrochlorid durch 3,5 cm³ Phosphatpuffer-Meerschweinchennierenextrakt 1:10 in Gegenwart von 1 mg NaCN; Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Xanthin; Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Theobromin; Kurve 4: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol 8-Methylkoffein; Kurve 5: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Theophyllin; Kurve 6: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Koffein.

Aminoxydase aus Meerschweinchenniere, so ergibt sich im ganzen ein gleiches Bild wie bei den Versuchen mit Leberextrakt. Die prozentualen Hemmungswerte für den Zeitpunkt 30 min nach Versuchsbeginn betragen beim Xanthin 7% Methylxanthin 5%, Theophyllin 34%, Theobromin 6%, Koffein 55% und Methylkoffein 15%. Beim Vergleich dieser Befunde mit den Konstitutionsformeln dieser Körper fällt auf, daß die an den beiden N-Atomen des Pyrimidinrings alkylierten Xanthinderivate Koffein und Theophyllin die Aminoxydase weitaus am stärksten hemmen. Viel schwächer wirkt das auch am Imidazolring zweimal methylsubstituierte 8-Methylkoffein. Theobromin, das am Pyrimidinanteil des Moleküls nur eine N-alkylierte Gruppe besitzt, ist fast ohne jede

Wirkung, ebenso das 8-Methylxanthin und das Xanthin selbst. Während, wie wir im ersten Teil der Arbeit sahen, die spezifische Cholinesterase am stärksten durch die am Imidazolring alkylierten Körper Theobromin, Koffein und 8-Methylkoffein gehemmt wird, wirken auf die Aminoxydase die ausschließlich oder vorwiegend am Pyrimidinanteil des Xanthins alkylierten Basen Theophyllin und Koffein.

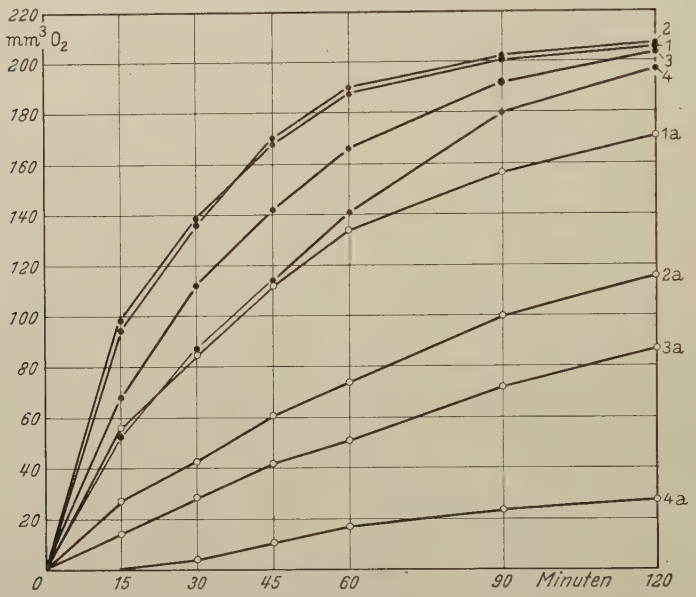


Abb. 5. Kurve 1: O_2-Verbrauch bei der fermentativen Oxydation von 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid durch 3,5 cm³ Phosphatpuffer-Meerschweinchenleberextrakt 1:10 in Gegenwart von 1 mg NaCN; Kurve 2: Wie Kurve 1 + 0,01 mMol Coffeinumnatrium salicylicum; Kurve 3: Wie Kurve 1 + 0,02 mMol Coffeinumnatrium salicylicum; Kurve 4: Wie Kurve 1 + 0,08 mMol Coffeinumnatrium salicylicum; Kurve 1a: Wie Kurve 1 an Stelle von 0,02 mMol Tyramin 0,02 mMol Adrenalinhydrochlorid; Kurve 2a: Wie Kurve 1a + 0,01 mMol Coffeinumnatrium salicylicum; Kurve 3a: Wie Kurve 1a + 0,02 mMol Coffeinumnatriumsalicilicum; Kurve 4a: Wie Kurve 1a + 0,08 mMol Coffeinumnatriumsalicylicum.

Die Hemmungswirkung der Xanthinderivate auf die fermentative Adrenalinoxydation nimmt mit Erhöhung ihrer Konzentration zu. Aus Abb. 5, Kurve 1a—4a ist der Einfluß von 0,01, 0,02 und 0,08 mMol Koffein auf die Geschwindigkeit der Adrenalinoxydation zu ersehen. In diesem Versuch wurde das Koffein durch einen Zusatz von äquimolaren Mengen Natriumsalicylat wasserlöslich gemacht. Kontrollversuche ergaben, daß die verwendeten Salizylsäuremengen keinerlei Einfluß auf die Aktivität der Aminoxydase ausüben. In Gegenwart von 0,08 mMol Koffein beträgt die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion Null.

Die Hemmung eines Enzyms erfolgt im wesesentlichen auf zwei Wegen: Entweder reagiert der Hemmungskörper mit dem hochmole-

kularen Fermentträger und bewirkt eine Blockierung der „aktivierenden Gruppen" des Enzyms oder er blockiert die „aktiven Gruppen", wobei er mit den Substratmolekülen in Konkurrenz treten muß. Der letztgenannte Vorgang wird in der angelsächsischen Literatur als „competetive inhibition" bezeichnet. In diesem Fall nimmt der Inhibitoreffekt mit steigender Substratkonzentration ab. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, sinkt die prozentuale Hemmungswirkung von 0,02 mMol Koffein bei einer Steigerung der Adrenalinkonzentration von 0,01 auf 0,08 mMol von 73 auf 52%. Der Effekt ist also im wesentlichen als „competetive inhibition" anzusprechen.

Unter denselben Bedingungen, unter denen wir die enzymatische Oxydation des Adrenalins durch Leber- und Nierenextrakte und deren Beeinflussung durch mehrere methylierte Xanthinderivate untersucht haben, wurde auch der fermentative Abbau des Tyramins geprüft. Es ergab sich, daß keine der untersuchten Substanzen in einer Menge von 0,01 mMol durch die die Adrenalinoxydation bereits erheblich gehemmt wurde, einen Einfluß auf den oxydativen Tyraminabbau auszuüben vermag. Wie aus der Abb. 5 Kurve 1—4 hervorgeht, beginnt z. B. die Wirkung des Koffeins, das unter den untersuchten Körpern den stärksten Hemmungseffekt auf die fermentative Oxydation des Tyramins ausübt, erst bei 0,02 mMol und ist durch eine weitere Erhöhung — bis auf 0,08 mMol — nur wenig zu steigern. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Affinität des Tyramins zur Aminoxydase größer ist als die des Adrenalins, so daß selbst mit Koffeinkonzentrationen, die die aktiven Gruppen des Enzyms für das Adrenalinmolekül total blockieren, nur eine teilweise Verdrängung des Tyraminmoleküls von den aktiven Gruppen des Ferments gelingt.

Tabelle 1. Ansatz: 3,5 cm³ Phosphatpuffer — Meerschweinchenleberextrakt 1 : 10 + 1 mg NaCN + 0,02 mMol Koffein. — Natrium salicylicum + Adrenalinhydrochlorid in steigenden Konzentrationen. Im Einsatz: 0,25 cm³ 7% KOH.

Adrenalin Mol	Hemmung in % nach 30 min	nach 60 min
0,01	73	70
0,02	69	62
0,04	60	54
0,08	52	48

Bei einem Vergleich der Kurve 1 mit 1a in Abb. 5 stellen wir fest, daß die Anfangsgeschwindigkeit der oxydativen enzymatischen Umsetzung des Tyramins um 75% über der des Adrenalins liegt, ein weiterer Beleg für die größere Affinität des Tyramins zur Aminoxydase.

Zusammenfassung.

Die spezifische Cholinesterase aus Erythrozyten und Gehirn wird durch Zusatz von 0,01 mMol Xanthin, 8-Methylxanthin, Theophyllin,

Koffein, Theobromin, 8-Methylkoffein und zwar in der genannten Reihenfolge in steigendem Maße gehemmt.

Auch die fermentative Oxydation von Adrenalin durch die Aminoxydase aus Meerschweinchenleber und -nieren wird durch Zusatz von 0,01 mMol 8-Methylkoffein, Theophyllin und vor allem Koffein gehemmt.

Der Hemmungseffekt auf die Aminoxydase kann durch Erhöhung der Konzentration der Hemmungskörper gesteigert werden. Durch Erhöhung der Substanzkonzentration wird er herabgesetzt.

Die fermentative Oxydation des Tyramins wird durch Zusatz von 0,01 m Mol der genannten Körper nicht beeinflußt. Erst durch höhere Konzentrationen wird ein Hemmungseffekt erzielt. Tyramin besitzt eine höhere Affinität zur Aminoxydase als Adrenalin.

Literatur.

[1] Heim, F., u. D. Amelung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 477 (1949). [2] Hanske, W.: Angew. Chem. **54**, 357 (1941). — [3] Zeller, E. A., u. A. Bissegger: Helvet. chim. Acta **26**, 1619 (1943). — [4] Nachmansohn, D., and H. Schneemann: J. of biol. Chem. **159**, 239 (1945).

Prof. Dr. F. Heim, Marburg a. d. Lahn,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 711—719 (1949).

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Testung der Antihistaminika Antistin, Neoantergan, Pyribenzamin und Synopen gegenüber der Histaminkreislaufwirkung mit fortlaufend registrierenden Methoden am gesunden Menschen.

Von

Helmut Gatzek und Kurt Mechelke.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Juli 1949.)

In einer zusammenfassenden Darstellung haben Meier und Bucher[1] die Pharmakologie der Antihistaminika eingehend behandelt. Sie weisen darauf hin, daß für die klinische Anwendung eines Antihistaminpräparates die Kenntnis folgender pharmakologischer Wirkungen erforderlich sei: 1. die spezifisch antagonistische Wirkung gegenüber Histamineffekten. 2. die antagonistische Wirkung gegenüber anaphylaktischen und allergischen Reaktionen und 3. die Allgemeinwirkung der Stoffe.

Die Prüfung des Antagonismus der Histaminolytika gegenüber den Histamineffekten wurde überwiegend nur am isolierten Organ in vitro oder einem Funktionssystem im Tierversuche geprüft. Meier und Bucher[1] stellen fest, daß der Antagonismus im allgemeinen am deutlichsten gegenüber den Histamineffekten, die sich in der glatten Muskulatur abspielen, hervortritt. Kreislaufreaktionen des Histamins sollen von den Histaminolytika weniger beeinflußt werden und die Histamineffekte auf die Drüsensekretion werden nur wenig abgeschwächt gefunden. Bei der Prüfung der antagonistischen Beeinflussung der Blutdruckwirkung des Histamins wurde ein unterschiedliches Verhalten beim narkotisierten und nicht narkotisierten Tier festgestellt. Eine Austestung der Wirksamkeit der verschiedenen Antihistaminika mit Hilfe eines Kreislauftestes ist bisher nicht gelungen.

Beim Menschen wurde die antagonistische Wirkung des Antistin gegenüber dem Histamin nur mit Hilfe der Histamin-Hautreaktion geprüft (Kallós und Kallós-Deffner[2]. Gleichzeitig berichten Kallós und Kallós-Deffner[2] über ihre Ergebnisse der Antistinbehandlung bei allergischen Erkrankungen.

Böhm und Jung[3] untersuchten die Beeinflussung der Histaminwirkung durch Calciumglukonat, Antistin, Antergan und Neoantergan. Sie wählten als Testobjekt den Temperaturverlauf über einer Histaminquaddel, welche durch Jontophorese mit einer 0,1%igen Histaminlösung erzeugt wurde. Neben dem Temperaturverlauf wurde vor allem das Ödem und kollaterale Erythem registriert. Sie glauben, daß mit dieser Methodik ein quantitativer Vergleich der Wirkung der einzelnen Histaminolytika möglich sei. Antergan und Neoantergan erweist sich in ihren Untersuchungen als erheblich wirksamer als Antistin oder Calciumglukonat.

Domenjoz und Jaques[4] berichten in jüngster Zeit über ein neues Antihistaminikum „Synopen", dem Monochlorhydrat des N-Dimethylaminoäthyl-N-p Chlorbenzyl- α-Aminopyridins. Bei der Prüfung der spezifischen antagonistischen Wirkungen gegenüber Histamineffekten und allergischen Reaktionen konnten Domenjoz und Jaques[4] feststellen, daß die Aktivität des Präparates die Wirkungsintensität des Neoantergans erreichen kann, und daß die Nebenerscheinungen im Vergleich zu anderen Histaminolytika gering sind. Gute klinische Erfahrungen mit Synopen (Geigy) in der Dermatologie haben Burckhardt und Steigrad[5] gemacht. In erster Linie soll das Symptom des Pruritus bei der Behandlung von Urtikaria, Ekzemen, Neurodermatitiden und Analpruritus gebessert werden oder verschwinden. Bei der peroralen Gabe erwies sich ihnen bei Erwachsenen eine tägliche Dosis von 200 mg als am günstigsten. Nur in akuten Zuständen halten sie die Injektionsbehandlung von 1—2 Ampullen für angezeigt. Burckhardt und Steigrad[5] betonen, daß das *Synopen* (Geigy) den besten Antihistaminika ebenbürtig sei und daß es sich besonders durch seine gute Verträglichkeit auszeichne.

Da in den Arbeiten von Meier und Bucher[1], Kallós und Kallós-Deffner[2], Domenjoz und Jaques[4], sowie Burckhardt und Steigrad[5] eine ausführliche Besprechung der Literatur der Antihistaminika erfolgte, erübrigt sich für unsere Fragestellung eine erneute Darstellung derselben.

Die Kreislaufwirkung des Histamins charakterisiert Matthes[6] als partielles Kollapssyndrom, bei dem die vorhandene Blutmenge infolge der starken Vasodilatation nicht ausreicht zur Steigerung der Durchblutung in allen Kreislaufgebieten. Er findet eine zweiphasische Wirkung des Histamins auf den Blutdruck (zuerst Blutdruckabfall, dann vorübergehenden geringen Blutdruckanstieg). Während des Blutdruckabfalls zeigt die Pulsfrequenz einen erheblichen Anstieg. Die Abnahme der Ohrtemperatur bei gleichzeitiger Zunahme des Volumens und der Sauerstoffsättigung führt er auf eine verminderte Durchblutung dieses Gefäßgebietes zurück. In der Mehrzahl findet Matthes[6] eine Abnahme des Fingervolumens mit noch stärkerem Abfall der Sauerstoffsättigung und gleichzeitigem Temperaturrückgang. Diese Änderungen deutet er als erhebliche druckpassive Durchblutungsminderung, da sie zu dem Zeitpunkt des Blutdruckabfalls auftreten. Mit Normalisierung des Blutdruckes nimmt das Volumen am Finger zu bei gleichzeitiger Verbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes. Die Atmung ist vertieft und beschleunigt (s. Matthes, Abb. 196).

Ziel unserer vorliegenden Untersuchungen ist es festzustellen, ob und inwieweit die Antihistaminika Antistin, Neoantergan, Pyribenzamin und Synopen (Geigy) die Kreislaufwirkungen des Histamins bei gesunden Menschen abschwächen oder auslöschen können. Weiterhin soll versucht werden, eine Testung der Wirksamkeit dieser Histaminolytika auf eine bestimmte Histamindosis quantitativ durchzuführen.

Methodik.

Die Untersuchungen wurden an 10 kreislaufgesunden Versuchspersonen ausgeführt. Die Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Nachdem die Versuchsperson 15 min auf einem Ruhebett gelegen hatte, wurden 25 γ Histamin in etwa 20 sec intravenös injiziert. Nach Abklingen des Histaminkreislaufeffektes wurde das Antihistaminikum durch die gleiche Kanüle in verschiedener Zeitdauer (20—60 sec) verabfolgt. In wechselnden Zeitabständen (2—20 min) wurden jetzt erneut 25 γ Histamin durch die gleiche Kanüle injiziert. Die Histamindosis

von 25 γ wurde konstant gehalten. Die Dosis der Antihistaminika und die Zeitdauer vom Ende der Injektion des Histaminolytikums bis zur zweiten Histamininjektion wurden variiert. Während der ganzen Zeit wurden fortlaufend registriert: Systolischer Blutdruck, Pulsfrequenz, Fingervolumen und Sauerstoffsättigung, Ohrvolumen und Sauerstoffsättigung, sowie Ohr- und Fingertemperatur und Atmung mit der von MATTHES[6] entwickelten Methode. Die Injektionsnadel blieb während des Versuches unverändert in der Vene liegen, um Schmerzreaktionen bei erneutem Einstechen zu vermeiden.

Ergebnisse.

A. Erste Injektion: 25 γ Histamin, zweite Injektion: 100 mg oder 200 mg Antistin, dritte Injektion: 25 γ Histamin (10 Versuche).

Die Abb. 1 zeigt die histaminolytische Wirkung von 200 mg Antistin gegenüber 25 γ Histamin. Die erste Histamininjektion bewirkt die charakteristischen Kreislaufreaktionen, wie sie von MATTHES[6] beschrieben wurden.

Der Blutdruck fällt rasch um etwa 30 mm Hg ab und steigt dann wieder an und überschreitet sein Ausgangsniveau vorübergehend um etwa 10 mm Hg. Während des Blutdruckabfalles sehen wir eine ausgeprägte Tachykardie. Nach initialer Vasokonstriktion am Ohr tritt eine beträchtliche Volumenzunahme ein bei gleichzeitiger Verbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes. Die Ohrtemperatur fällt zuerst ab und steigt mit der Volumenzunahme geringfügig an. Auch am Finger sehen wir eine Mehrdurchblutung und Aufbesserung der Sauerstoffsättigung. Die Fingertemperatur zeigt dabei eine geringe Abnahme. Die Atmung wird etwas beschleunigt und vertieft.

Nach $3^1/_2$ min wurden innerhalb einer Minute 200 mg Antistin injiziert. Wir sehen bereits während der Injektion (30 sec nach Beginn der Injektion) eine Mehrdurchblutung am Ohr mit Zunahme der Sauerstoffsättigung. Nach Ende der Injektion wird dieser vasodilatorische Effekt noch deutlicher. Auch am Finger ist eine geringe Volumenzunahme mit Aufbesserung der Sauerstoffsättigung zu beobachten (geringe Empfindlichkeit der Fingerstrahlen). Die Temperaturen laufen den Volumenschwankungen parallel. Systolischer Blutdruck und Pulsfrequenz, sowie die Atmung zeigen nach Antistin in diesem Versuch keine wesentlichen Veränderungen. Auf dem Höhepunkt der Antistinwirkung (nach 100 sec) wurden erneut in 20 sec 25 γ Histamin intravenös gegeben. Eine stark abgeschwächte Histaminwirkung wird sichtbar. Der Blutdruck fällt langsam um 10—15 mm Hg ab und die Pulsfrequenz wird geringfügig beschleunigt. Am Ohr sehen wir angedeutet zunächst eine Vasokonstriktion, die in eine deutliche Vasodilatation übergeht. Veränderungen der Sauerstoffsättigung des Blutes treten nicht ein. Auch am Finger beobachten wir einen eben angedeuteten vasokonstriktorischen Effekt. Dieser Versuch zeigt einmal, daß Antistin eine beträchtliche Abschwächung der Kreislaufwirkung des Histamins bewirkt und zum anderen, daß Antistin selbst eine gefäßaktive Substanz ist, die Veränderungen des Kreislaufs bewirkt.

In neun weiteren Versuchen konnten wir die histaminolytische Wirkung des Antistin in gleicher Weise beobachten. Verringert man die Antistindosis auf 100 mg, so tritt die Kreislaufwirkung von 25 γ Histamin wieder deutlicher hervor. Besonders der Blutdruckabfall bei gleichzeitiger Tachykardie ist nach 100 mg Antistin deutlicher. Die Mehrdurchblutung am Ohr wird durch Antistin in unseren Versuchen stets nur abgeschwächt, aber niemals vollständig aufgehoben. Ein

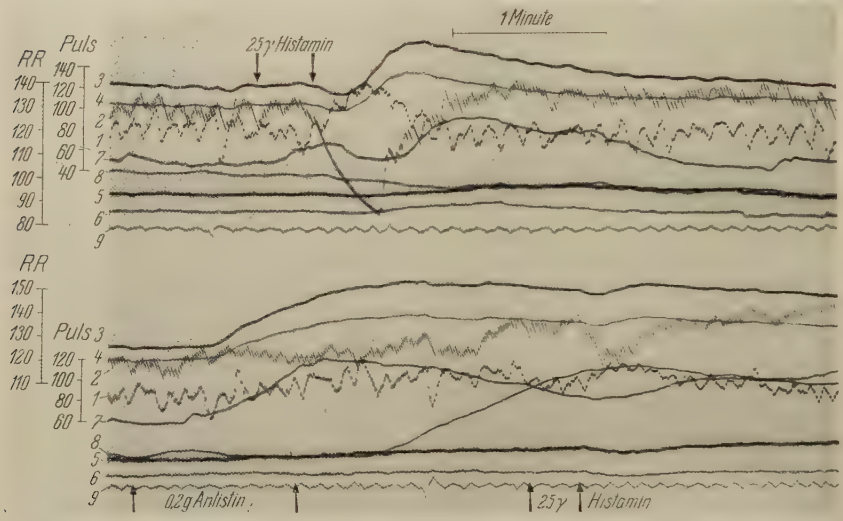


Abb. 1. Versuchsperson K. M. Obere Kurve: 1. Injektion 25 γ Histamin. Untere Kurve: 2. Injektion 200 mg Antistin, 3. Injektion 25 γ Histamin. Deutliche Abschwächung der Histamin-Kreislaufwirkung durch 200 mg Antistin. *1* Pulsfrequenz; *2* Systolischer Blutdruck; *3* Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen); *4* Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen); *6* Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung; *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

Nachlassen der Antistinwirkung können wir auch feststellen, wenn wir die zweite Histamininjektion zu einem späteren Zeitpunkt ausführen. Während wir 60 sec nach Beendigung der Injektion von 100 mg Antistin eine deutliche Abschwächung des Histamineffektes beobachten können, tritt bei Histamingabe nach 3 min dieser bereits wieder deutlicher hervor. Die Beschleunigung und Vertiefung der Atmung nach Histamin wird durch die Antistinwirkung dem Grade der Abschwächung entsprechend gemindert. Die Versuche zeigen, daß für den Nachweis der Histaminolyse auf den Kreislauf beim gesunden Menschen das Verhalten des systolischen Blutdruckes, der Pulsfrequenz und der Ohrdurchblutung von besonderem Wert ist. Die Abb. 2 zeigt die Wirkung einer intravenösen Injektion von 125 mg Antistin. Wir sehen einen geringen Blutdruckabfall (etwa 10 mm Hg), der 10 sec nach Ende der Injektion

einsetzt. Gleichzeitig können wir eine Zunahme der Herzschlagfolge bei gleichzeitiger Abnahme der Gesamthöhe der Pulsfrequenzschwankungen feststellen. Sowohl am Ohr als auch am Finger tritt eine deutliche anhaltende Mehrdurchblutung ein, bei gleichzeitiger Verbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes. Die Ohrtemperatur und die Fingertemperatur nehmen erheblich zu. Die Atmung wird etwas vertieft und beschleunigt.

Diese Kreislaufwirkungen des Antistin finden wir in jedem Versuch mehr oder weniger deutlich ausgeprägt. Das Ausmaß des Blutdruckabfalles ist abhängig von der Injektionsgeschwindigkeit des Präparates.

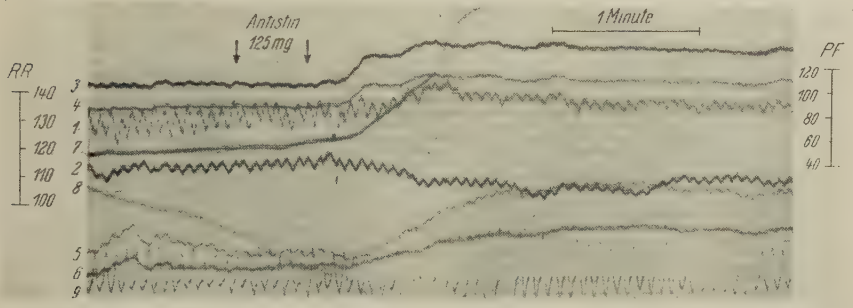


Abb. 2. Versuchsperson H. G. Intravenöse Injektion von 125 mg Antistin. Deutliche Mehrdurchblutung an Ohr und Finger, geringer Blutdruckabfall, geringe Tachykardie. *1* Pulsfrequenz; *2* Systolischer Blutdruck; *3* Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen); *4* Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen); *6* Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

Wird Antistin in einer Minute injiziert, so tritt nur eine geringe Blutdrucksenkung (10 mm Hg) ein, wird es in 20—30 sec injiziert, sehen wir Blutdrucksenkungen von 30 mm Hg. Entsprechend dem Ausmaß des Blutdruckabfalles beobachten wir eine verschieden starke Pulsfrequenzzunahme (spiegelbildliches Verhalten von Blutdruck und Pulsfrequenz). Die Durchblutungszunahme nach Antistin tritt vorwiegend am Finger auf. In 6 Versuchen sehen wir eine Volumenzunahme mit Verbesserung der Sauerstoffsättigung am Ohr und Finger, in 4 Versuchen tritt eine Verminderung der Durchblutung am Ohr auf bei gleichzeitiger deutlicher Vasodilatation am Finger. Die Temperaturen verlaufen entsprechend den Volumenschwankungen. Es fällt auf, daß die Mehrdurchblutung nur langsam zunimmt. Dieser allmähliche und dauerhafte Anstieg des Blutgehaltes steht im Gegensatz zu der rasch einsetzenden, aber flüchtigen Mehrdurchblutung nach Histamin, Doryl und Amylnitrit. Die Antistinwirkung ähnelt im Vergleich dem Kreislaufbild des Dihydroergocornin und erinnert an die Veränderungen des Kreislaufes, wie wir sie bei Priscol und Ronicol (Roche) gesehen haben.

Zusammenfassend zeigen unsere Versuche, daß die Kreislaufwirkung von 25 γ Histamin durch 200 mg Antistin deutlich abgeschwächt wird und auch durch 100 mg Antistin noch wesentlich vermindert erscheint. Die Injektion der zweiten Histamindosis muß jedoch auf dem Höhepunkt der Antistinwirkung (60—100 sec nach Ende der Antistininjektion) gegeben werden. Das Antistin selbst bewirkt Veränderungen des Kreislaufs, die an die Wirkung von Priscol erinnern.

B. Erste Injektion: 25 γ Histamin, zweite Injektion: 0,1—0,5—2,0 bis 5,0—10,0—40,0 mg Neoantergan, dritte Injektion: 25 γ Histamin (6 Versuche).

In gleicher Weise wurde die histaminolytische Wirkung von Neoantergen untersucht. Die Histamindosis wurde wiederum konstant gehalten (25 γ Histamin in 20 sec), während die Neoantergandosierung variiert wurde. Wir können feststellen, daß 0,5—40 mg Neoantergan intravenös eine Auslöschung oder weitgehende Abschwächung des Kreislaufeffektes von 25 γ Histamin bewirken. Die zweite Histamininjektion wurde 2 oder 3 min nach Ende der Neoanterganinjektion gegeben. Weder eine Mehrdurchblutung am Ohr noch ein blutdrucksenkender Effekt traten nach vorheriger Neoantergangabe bei der nachfolgenden Histamininjektion auf. In einem Versuch haben wir die Wirkung von 0,1 mg Neoantergan geprüft. Dabei konnten wir beobachten, daß selbst diese geringe Dosis noch zu einer Abschwächung des Histaminkreislaufeffektes führt. Wir sehen in diesem Versuch nach der zweiten Histamininjektion einen geringeren und langsameren Blutdruckabfall gegenüber der Erstinjektion von Histamin mit entsprechend geringerer Tachykardie. Auch die nach Histamin einsetzende Mehrdurchblutung an Ohr und Finger wird durch 0,1 mg Neoantergan vermindert. Die Steigerung der Atemfrequenz und Vertiefung der Atemzüge tritt nach vorheriger Neoantergangabe bei nachfolgender Histamininjektion nicht mehr auf.

Unsere Versuche zeigen, daß Dosen von 0,1 mg Neoantergan genügen, um den Histaminkreislaufeffekt von 25 γ Histamin abzuschwächen und 0,5 mg Neoantergan bereits eine fast vollständige Aufhebung desselben bewirken. Neoantergan selber führt in der von uns verwendeten Dosierung zu keinen Veränderungen der registrierten Kreislaufgrößen.

C. Erste Injektion: 25 γ Histamin, zweite Injektion: 1—5—10 bis 15 mg Pyribenzamin, nach 3 min dritte Injektion: 25 γ Histamin (5 Versuche).

Diese Versuche wurden in gleicher Weise wie die Neoanterganuntersuchungen durchgeführt. Wir finden, daß bereits 1 mg Pyribenzamin zu einer geringen Abschwächung der Histaminkreislaufwirkung führt. Die Blutdrucksenkung mit der reflektorischen Tachykardie und die

Mehrdurchblutung am Ohr sind geringer ausgeprägt. Nach 5 mg Pyribenzamin sehen wir eine deutlichere histaminolytische Wirkung. Der Blutdruckabfall und die Pulsfrequenzsteigerung sind jedoch noch in geringem Maße vorhanden. 10 und 15 mg Pyribenzamin dagegen bewirken eine fast vollständige Aufhebung des Histaminkreislaufeffektes. Die Kurvenbilder dieser Versuche entsprechen der Abb. 3.

D. Erste Injektion: 25 γ Histamin, zweite Injektion: 0,5—1—5,0 bis 10—20 mg Synopen (Geigy), dritte Injektion: 25 γ Histamin (17 Versuche).

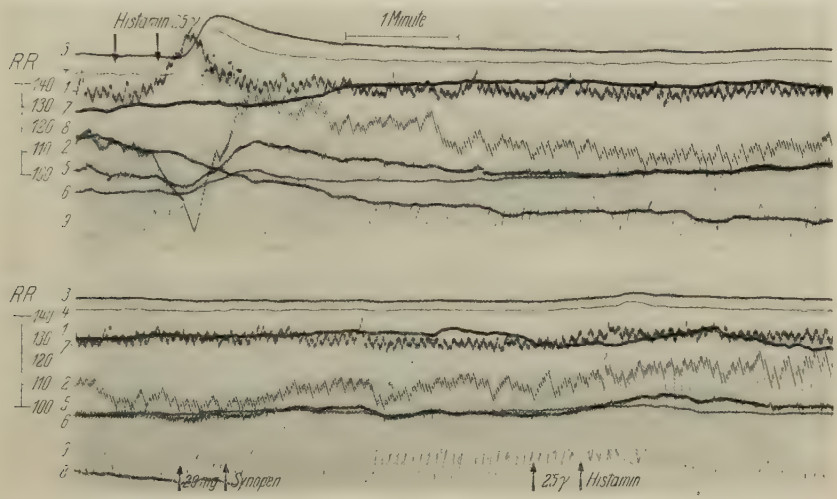


Abb. 3. Versuchsperson K. M. Obere Kurve: 1. Injektion 25 γ Histamin. Untere Kurve: 2. Injektion 20 mg Synopen. 3. Injektion 25 γ Histamin. Durch 20 mg Synopen Aufhebung der Histamin-Kreislaufwirkung. *1* Pulsfrequenz; *2* Systolischer Blutdruck; *3* Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen); *4* Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen); *6* Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

Während wir die Testung von Neoantergan nur durch Veränderung der Neoantergandosis durchführten, variierten wir bei der Prüfung des Synopen (Geigy) einmal die Synopendosis und zum anderen den zeitlichen Abstand vom Ende der Synopeninjektion bis zur nachfolgenden Histamingabe.

Unsere Versuche zeigen, daß Dosen von 1—20 mg Synopen zu einer fast vollständigen Aufhebung des Histaminkreislaufeffektes führen, wenn die zweite Histamininjektion 3 min nach dem Histaminolytikum gegeben wird. Die Abb. 3 zeigt einen derartigen Versuch, der als typisches Beispiel für die Synopenwirkung in Dosen von 1—20 mg dienen möge. Wir sehen nach der ersten Histamininjektion die charakteristischen Veränderungen der einzelnen Kreislaufgrößen. Nach Normalisierung der durch Histamin hervorgerufenen Kreislaufumstellungen

wurden 20 mg Synopen intravenös injiziert. 180 sec nach Ende der Injektion des Histaminolytikums bewirkt die zweite Histamininjektion keine wesentlichen Kreislaufveränderungen. Nur am Ohr und am Finger sehen wir eben angedeutet eine Mehrdurchblutung. Erst

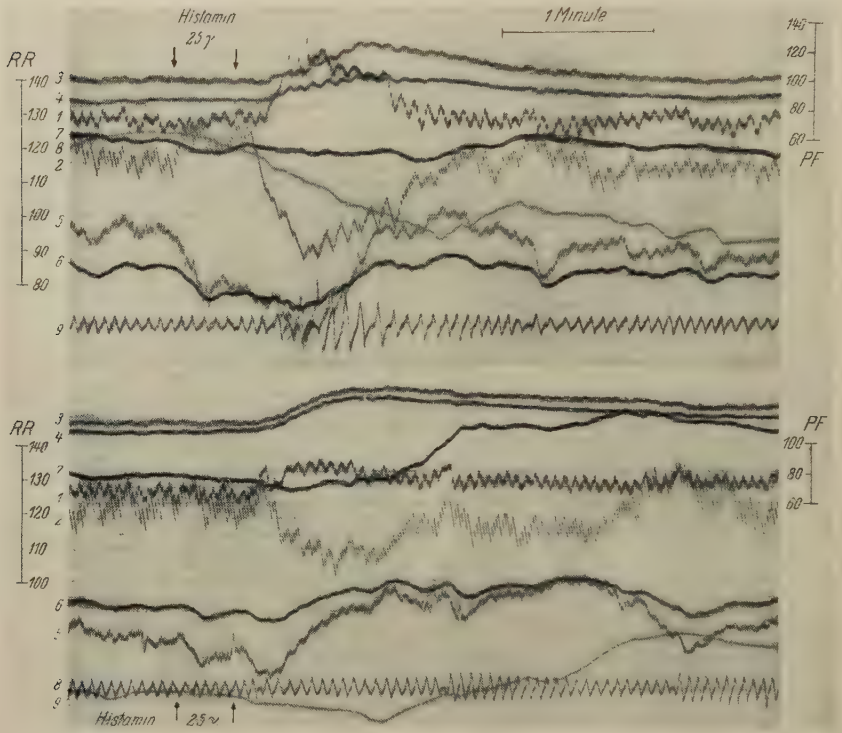


Abb. 4. Versuchsperson W. P. Obere Kurve: Histamin-Kreislaufwirkung vor Synopengabe. Untere Kurve: Histamin-Kreislaufwirkung 20 min nach vorheriger Injektion von 10 mg Synopen. Abschwächung der Histaminkreislaufwirkung (zeitliche Austestung) *1* Pulsfrequenz; *2* Systolischer Blutdruck; *3* Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen); *4* Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *5* Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen); *6* Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung); *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

bei Gaben von 0,5 mg Synopen führt die nachfolgende Histamininjektion zu einer abgeschwächten Kreislaufwirkung.

Bei Verabreichung von 10 mg Synopen tritt erstmalig nach etwa 15—20 min wieder eine verminderte Histaminwirkung auf. Die Abb. 4 zeigt die Histaminwirkung vor und 20 min nach Injektion von 10 mg Synopen. Wir sehen, daß Histamin nach Synopen einen geringeren und langsameren Blutdruckabfall mit dementsprechend abgeschwächter Pulsfrequenzzunahme bewirkt. Die Mehrdurchblutung an Ohr und Finger ist gleichfalls abgeschwächt.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß Synopen die Wirkungsintensität des Neoantergan nahezu erreicht und ebenso wie Neoantergan in der von uns verwendeten Dosierung keine eigene Kreislaufwirkung besitzt.

Nebenwirkungen.

Nach Antistin bemerken unsere Versuchspersonen vor allem ein Wärmegefühl am ganzen Körper, mehrfach wurde ein schlechter Geschmack angegeben. Neoantergan führt besonders bei Dosen über 5 mg zu deutlichen Nebenerscheinungen. Wir konnten Übelkeit, Erbrechen, allgemeines Schwächegefühl, Benommenheit und Kopfschmerzen beobachten. In der von uns angewendeten Dosierung wurden nach Pyribenzamin keine Nebenwirkungen beobachtet. Nach Synopen gaben die Versuchspersonen in einigen Fällen einen etwas üblen Geschmack an und vereinzelt trat Müdigkeit auf. Die Nebenwirkungen stehen in keinem Zusammenhang mit der Kreislaufwirkung dieser Antihistaminika.

Zusammenfassung.

Es konnte gezeigt werden, daß mit den fortlaufend registrierenden Methoden nach Matthes[6] am gesunden Menschen die Antihistaminika gegenüber der Histaminkreislaufwirkung quantitativ ausgetestet werden können. Die Testung wurde bei den Histaminolytika Antistin, Neoantergan, Pyribenzamin und Synopen (Geigy) durchgeführt. Darüber hinaus kann die Wirkungsdauer eines Antihistaminpräparates mit dieser Methodik bestimmt werden.

Literatur.

[1] Meier, R., u. K. Bucher: Fortschritte der Allergielehre Bd. II, S. 290. — [2] Kallós, P., u. L. Kallós-Deffner: Fortschritte der Allergielehre, Bd. II, S. 329. Basel: S. Karger 1949. — [3] Böhm, K., u. F. Jung: Klin. Wschr. **1949**, 264. — [4] Domenjoz u. Jaques: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 476. — [5] Burckhardt u. Steigrad: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 480. — [6] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart: Georg Thieme. (Erscheint demnächst.)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 207, S. 720—730 (1949).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Untersuchungen über das Wirkungsbild der Mutterkornalkaloide Ergotamin, Dihydroergotamin und Dihydroergocornin am gesunden Menschen.

Von
Helmut Gatzek, Karl Matthes und Kurt Mechelke.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Dezember 1948.)

Durch die Untersuchungen von Stoll und Rothlin sind die verschiedenen Mutterkornalkaloide in den Vordergrund des therapeutischen Interesses gestellt worden. Stoll und Hofmann[1] gelang es, aus dem Ergotoxin drei neue Alkaloide zu isolieren: Ergocristin, Ergocornin, Ergocryptin. Die Dihydroderivate dieser Verbindungen entwickeln nach den Ergebnissen von Rothlin[2, 3, 4, 5] im Tierversuch besondere pharmakologische Wirkungen. Grundsätzlich werden allen diesen Stoffen sympathikolytische Eigenschaften zugesprochen. Besonders das Ergotamin hat daneben aber noch eine konstriktorische Wirkung auf die glatte Muskulatur, die sich am Gefäßapparat in Vasokonstriktion mit Tendenz zur Blutdrucksteigerung zeigt. Diese, den sympathikolytischen Effekt verschleiernde vasokonstriktorische Wirkung, ist beim hydrierten Ergotamin DHE 45 und noch mehr bei DHO 180 abgeschwächt.

Besonders eingehend wurden das Ergotamintartrat (Gynergen) und das Dihydroergotamin (DHE 45) am Menschen untersucht. Nordenfelt[6] glaubt, in experimentellen Untersuchungen eine Normalisierung des sympathikotonen EKG nach Injektionen von 0,5 mg Ergotamin gesehen zu haben. Leitner[7] benutzt diese Erkenntnisse zur Ausarbeitung einer neuen EKG-Funktionsprüfung mit Gynergen. Er unterscheidet damit funktionelle, vom vegetativen Nervensystem bedingte elektrokardiographische Veränderungen von wirklichen Myokardschäden. In Untersuchungen am Menschen fand Spühler[8, 9], daß das DHE 45 sympathikotone elektrokardiographische Veränderungen noch eindeutiger als Gynergen normalisiert. Gleichzeitig stellte er nach DHE 45 eine Verlangsamung der Pulswellengeschwindigkeit, eine Erniedrigung des Blutzuckerspiegels und eine Abschwächung oder Unterdrückung der Adrenalinhyperglykämie fest. Diese Befunde werden durch die Ergebnisse von Ott[10] gestützt, der eine Normalisierung des im Saunaheißluftbad auftretenden sympathikotonen EKG durch DHE 45 feststellen konnte. Er sieht in der Normalisierung des Sauna-EKG durch DHE 45 den Beweis für das Vorliegen eines gesteigerten Sympathikotonus im Heißluftbad. Steinmann, Lüdi und Barben[11] bestätigen in ihren Untersuchungen die Erhöhung der T-Zacke nach Gynergengaben. Sie fanden gleichzeitig folgende Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen nach Wezler-Böger und Verschiebungen der Anspannungs- und Austreibungszeit nach Blumberger: Geringe

Zunahme des systolischen Druckes, Steigerung des diastolischen Druckes, Abnahme der Druckamplitude, Abnahme der Pulsfrequenz, leichter Anstieg der Pulswellengeschwindigkeit und des elastischen Widerstandes, Schlag- und Minutenvolumenabnahme und Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes. Die Anspannungszeit des Herzens wurde verkürzt gefunden, die Austreibungszeit zeigte nur in geringem Maße eine Abnahme. Die Autoren sprechen die Vermutung aus, daß das Ergotamin wahrscheinlich eine direkte antiadrenergische Herzwirkung besitzt und an den peripheren Gefäßen angreift. In tierexperimentellen Untersuchungen stellten v. Euler und Hesser[12] eine hemmende Wirkung von Gynergen und DHE 45 auf den Sinusentlastungsreflex fest. Die 3 Mutterkornalkaloide Gynergen, DHE 45 und DHO 180 wurden von Bluntschli und Götz[13] in ihrer Wirkung auf den menschlichen Kreislauf untersucht. Sie fanden, daß Gynergen und DHE 45 sowohl eine direkte Wirkungskomponente mit Angriffspunkt an der glatten Muskulatur, als auch eine sympathikolytische Wirkungskomponente enthalten. DHO 180 dagegen soll nur sympathikolytisch wirken. An der präganglionär sympathektomierten Gliedmaße fehlte eine sympathikolytische Wirkung bei allen drei Mutterkornalkaloiden. Die Verfasser berichten erstmalig über die therapeutische Wirkung von DHO 180 bei Hypertonien. In allen Experimenten fanden sie sowohl bei Normalen als auch bei Hypertonikern eine Blutdrucksenkung. Bei Kranken mit nicht fixiertem Hochdruck traten die deutlichsten blutdrucksenkenden Effekte auf. Interessant ist, daß bei einer Patientin nach transdiaphragmatischer Splanchniektomie sich keine Blutdrucksenkung erzielen ließ und bei zwei Patienten nach der Smithwick-Operation nur geringe Blutdrucksenkungen zu beobachten waren. In elektrokardiographischen Untersuchungen stellten sie eine geringe Abnahme der Herzfrequenz fest, die zeitlich nicht mit dem Abfall des Blutdruckes zusammenfiel. Als Nebenerscheinungen traten Anschwellen der Nasenschleimhautgefäße und Allgemeinsymptome (Müdigkeit und Schläfrigkeit) auf. Gelegentlich wurde eine unregelmäßige Atmung gesehen. Bei großen Dosen soll es zur Nausea mit nachfolgendem Erbrechen kommen. Die Blutdrucksenkung soll mit diesen Begleitsymptomen zeitlich in keinem Zusammenhang stehen.

Gute therapeutische Erfolge mit DHE 45 wurden besonders von Horton, Peters und Blumenthal[14] sowie von Lennox[15] in der Behandlung der Migräne erzielt. Birkhäuser[16] sieht im DHE 45 ein spezifisch wirkendes Therapeutikum gegen frischen Herpes simplex. Bei Raynaudscher Erkrankung findet Lenggenhager[17] eine ausgezeichnete spasmolytische Wirkung von DHE 45. Infeld[18] berichtet über gute Therapieerfolge mit DHE 45 bei peripheren Durchblutungsstörungen. Spühler[9] beobachtet therapeutische Erfolge bei Migräne, labilem Hochdruck, Herpes zoster und koronaren Durchblutungsstörungen. Psychomotorisch-schizophrene Erregungszustände sollen nach Pritzker[19] durch DHE 45 gedämpft werden. Er beobachtet gleichzeitig eine Senkung des erhöhten Blutdruckes und eine Erniedrigung der beschleunigten Pulsfrequenz. Atropin und Bellafolin sollen bei geeigneter Dosierung die Wirkung von DHE 45 verstärken und die Schlafmitteltherapie ersetzen.

Mit den von Matthes[20] angegebenen Methoden der fortlaufenden Registrierung von Pulsfrequenz, systolischem Blutdruck, Volumen und Sauerstoffsättigung an Ohr und Finger, Temperatur an Ohr und Finger und der Atmung untersuchten wir das Wirkungsbild der Ergotaminalkaloide Gynergen, DHE 45 und DHO 180 am gesunden Menschen. In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde versucht, einen sympathikolytischen Effekt dieser Präparate am Menschen nachzuweisen, indem

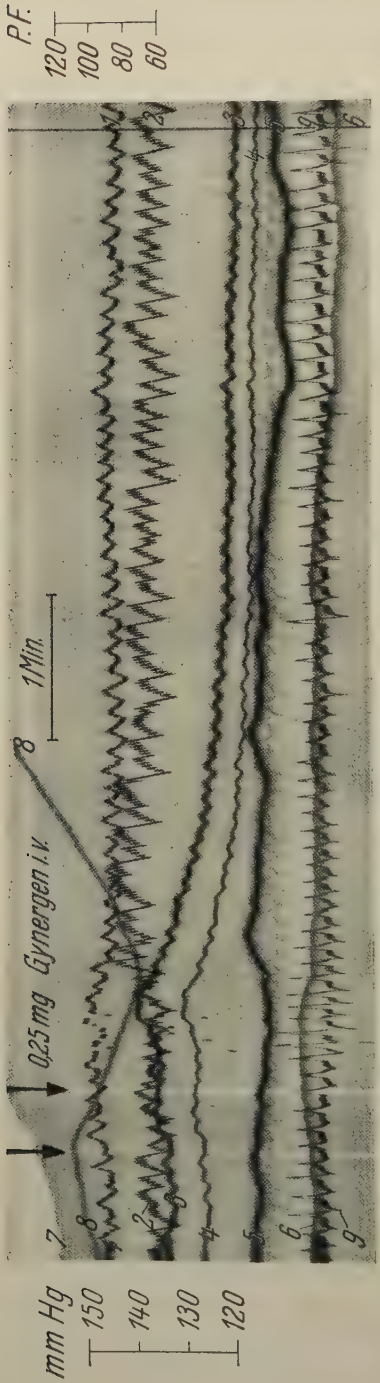


Abb. 1. Intravenöse Injektion von 0,25 mg Gynergen.

unmittelbar vor und nach Injektion der Ergotaminalkaloide verschieden kleine Dosen von Adrenalin eingespritzt wurden.

Ergebnisse.

a) Ergotamintartrat (Gynergen): Auf der Abb. 1 sieht man die Wirkung einer intravenösen Injektion von 0,25 mg Gynergen. Der Blutdruck zeigt bei allen Versuchspersonen eine geringgradige, aber langanhaltende Steigerung. Die Pulsfrequenz nimmt im Beginn zu und während des Blutdruckanstieges geringgradig ab. Am Ende des Versuches (10 Min.) kehrt die Pulsfrequenz wieder zum Ausgangswert zurück.

Nach vorübergehender Volumenzunahme, die auf den meisten anderen Kurven nicht nachweisbar ist, sieht man eine langdauernde Vasokonstriktion ohne wesentliche Änderung der Sauerstoffsättigung. Diese Abbildung zeigt keine wesentliche Wirkung am Finger. Bei anderen Versuchspersonen sehen wir besonders bei Anwendung etwas höherer Dosen eine gleichzeitige Vasokonstriktion am Finger, meist mit Abnahme der Sauerstoffsättigung. Bei kleineren Dosen (0,4 cm^3 Gynergen) kann sogar eine Zunahme von Volumen, Sauerstoffsättigung und Temperatur an der Hand eintreten bei gleichzeitiger Vasokonstriktion am Ohr.

Während der anfänglichen Pulsbeschleunigung ist die Atmung etwas vertieft und beschleunigt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der gewählten Dosierung

eine deutliche vasokonstriktorische Wirkung des Ergotamins auf die Gefäßmuskulatur nachweisbar ist. Die konstriktorische Wirkung ist am deutlichsten am Ohr nachzuweisen. Bei höherer Dosierung in gleicher Weise auch an der Hand. Bei kleineren Dosen sieht man am Finger eher eine Durchblutungszunahme. Der Gefäßengerstellung entspricht die anhaltende geringfügige Erhöhung des systolischen Blutdruckes.

Pulsfrequenz und Atmung sind im Anfang geringgradig beschleunigt.

Der Nachweis eines sympathikolytischen Effektes wurde bei 3 Personen versucht, indem unmittelbar vor und 10—15 Min. nach 0,25 mg Gynergen 0,02 mg Suprarenin intravenös gegeben wurde. Die Dosierung von Adrenalin wurde absichtlich so klein gehalten, da gerade bei diesen geringen Adrenalinmengen die initiale Blutdrucksenkung, als auch der sekundäre Blutdruckanstieg wirkungsvoll hervortritt. Eine Abschwächung der Adrenalinwirkung oder eine Verstärkung der blutdrucksenkenden Initialphase konnte nicht erzielt werden, obgleich im Augenblick der zweiten Adrenalingabe die Gynergenwirkung mit Vasokonstriktion und Blutdruckanstieg nicht abgeklungen war.

b) Dihydroergotamin (DHE 45): Die Abb. 2 zeigt die Wirkung einer intravenösen Injektion von 1,0 cm³ DHE 45 (1 mg). Bei unseren 6 Versuchspersonen sieht man eine deutliche Volumenabnahme bei gleichbleibender Sauerstoffsättigung am Ohr, am Finger finden wir übereinstimmend eine geringe Volumenzunahme mit Zunahme der Sauerstoffsättigung. Die Temperaturen verhalten sich entsprechend den Volumenänderungen der Extremitätenenden (Ohrtemperatur fällt ab, Fingertemperatur nimmt zu).

Der Blutdruck zeigt bei 5 Versuchspersonen einen geringen (10 bis 15 mm Hg), lang anhaltenden Anstieg über das Ausgangsniveau,

Abb. 2. Intravenöse Injektion von 1 mg DHE 45.

bei einer Versuchsperson tritt eine geringe Blutdrucksenkung um etwa 10 mm Hg ein. Der Blutdruck hat am Ende der Registrierung (nach 10 Min.) seinen Ausgangswert noch nicht erreicht. Die Atemfrequenz wird etwas herabgesetzt, die Atemtiefe gering abgeflacht. Die Pulsfrequenz wird nicht wesentlich beeinflußt, nur bei 2 Versuchspersonen beobachten wir eine geringe initiale Tachykardie.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Versuchen ersehen, daß nach Gaben von 1,0 mg DHE 45 noch eine deutliche vasokonstriktorische Wirkung am Ohr erkennbar ist, während am Finger die Vasokonstriktion nicht mehr eintritt. In der überwiegenden Mehrzahl der Versuche finden wir eine geringe anhaltende Erhöhung des Blutdrucks, wie wir sie in gleicher Weise beim Gynergen beobachten konnten. Der Unterschied von Gynergen und DHE 45 ist demnach vor allem im Fehlen einer vasokonstriktorischen Wirkung des DHE 45 am Finger zu sehen. Am Ohr erscheint die vasokonstriktorische Wirkung in der Mehrzahl der Fälle abgeschwächt. Nur bei einer Versuchsperson finden wir nach DHE 45 eine geringe anhaltende Blutdrucksenkung. Eine initiale Beschleunigung und Vertiefung der Atmung wie bei Gynergen können wir bei DHE 45 nicht feststellen, es tritt im Gegenteil eher eine Abflachung und niedrigere Atemfrequenz auf. Die Pulsfrequenz zeigt keine Veränderungen.

Zum Nachweis der sympathikolytischen Wirkung des DHE 45 wurde bei 6 Versuchspersonen unmittelbar vor und 5—15 Min. nach Gabe von 1 mg DHE 45 0,02—0,06 mg Adrenalin intravenös gegeben. Während der zweiten Injektion von Adrenalin war die Wirkung von DHE 45 immer voll ausgeprägt. Trotzdem war der Adrenalineffekt keineswegs abgeschwächt. Der Bludruckanstieg erschien im Gegenteil etwas erhöht und verlängert. Auch die Vasokonstriktionen an den Extremitätenenden (Ohr und Finger) waren nach der zweiten Adrenalininjektion ebenso deutlich wie nach der ersten. Die Veränderungen der Herzfrequenz, der Sauerstoffsättigung des Blutes, der Hauttemperatur und der Atmung waren in gleichem Ausmaß nachweisbar.

In gleicher Weise wurde versucht, die sympathikolytische Wirkung mit Sympatol zu prüfen. Kurz vor und nach Gabe von DHE 45 wurde bei 7 Versuchspersonen 30, 45 oder 60 mg Sympatol intravenös gegeben. Hier sieht man, daß die Wirkung der zweiten Sympatolinjektion nach vorheriger Gabe von DHE 45 in allen Versuchen verstärkt ist. Die Vasokonstriktion an Ohr und Finger ist deutlicher, besonders auffallend ist die lang anhaltende Blutdrucksteigerung nach der zweiten Sympatolinjektion. Der Blutdruck erreicht erst nach 5—10 Min. sein Ausgangsniveau, in 3 Versuchen hat er es am Ende der Registrierung (15 Min. nach der zweiten Sympatolinjektion) noch nicht wieder erreicht.

c) Dihydroergocornin DHO 180: Die Abb. 3 zeigt die Wirkung einer intravenösen Injektion von 1,0 cm³ DHO 180 (0,5 mg). Man sieht einen langsamen, anhaltenden Blutdruckabfall um 20 mm Hg, gleichzeitig tritt eine deutliche Volumenzunahme am Ohr auf, bei gleichbleibender Sauerstoffsättigung. Am Finger sehen wir eine Volumenzunahme mit geringer Zunahme der Sauerstoffsättigung. Beide Temperaturen nehmen zu. Die Pulsfrequenz zeigt eine geringe Abnahme um etwa 10 Schläge je Minute. Die Atmung ist unverändert. Die Kurvenbilder der übrigen drei normalen Versuchspersonen bestätigen diesen Befund, zwei von ihnen zeigen einen länger als 15 Min. anhaltenden Blutdruckabfall um 15—20 mm Hg bei gleichzeitiger Abnahme der Pulsfrequenz um 10—15 Schläge in der Minute. Es findet sich eine deutliche Zunahme des Blutgehaltes an Ohr und Finger mit Zunahme der Hauttemperaturen und geringer Zunahme der Sauerstoffsättigung des Kapillarblutes am Finger. Die dritte Versuchsperson zeigt nur eine nach 5 Min. vorübergehende Blutdrucksenkung um 10 mm Hg, während das Fingervolumen sowie die Sauerstoffsättigung des Fingerblutes eine geringe Abnahme aufweisen.

Zum Nachweis der sympathikolytischen Wirkung von DHO 180 erhielten 5 normale Versuchspersonen zuerst 0,03 mg Adrenalin, nach 15 Min. 1,0 cm³ DHO 180 und 5 Min. später wieder 0,03 mg Adrenalin. Nach DHO 180 zeigt sich dabei viermal eine deutliche Vasodilatation an Ohr und Finger mit Anstieg der Hauttemperaturen, nur bei einem Versuch bleiben

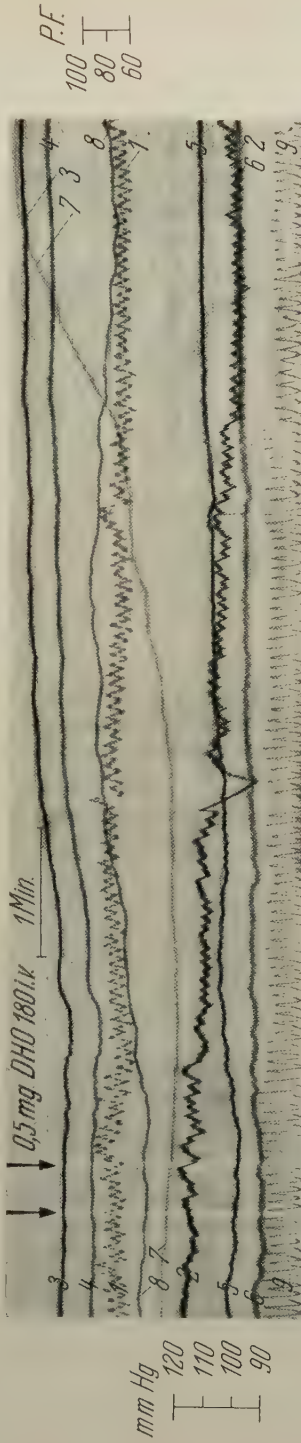


Abb. 3. Intravenöse Injektion von 0,5 mg DHO 180. *1* Pulsfrequenz; *2* Systolischer Blutdruck; *3* Ohrdurchleuchtung ultrarot; *4* Ohrdurchleuchtung rot; *5* Fingerdurchleuchtung ultrarot; *6* Fingerdurchleuchtung rot; *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

P.F.
120
100
80
60
mm Hg
170
160
150
140
130
120
110
100
1 Min.
30 γ Adrenalin i.v.
0,5 mg DHO 180 i.v.
a
b

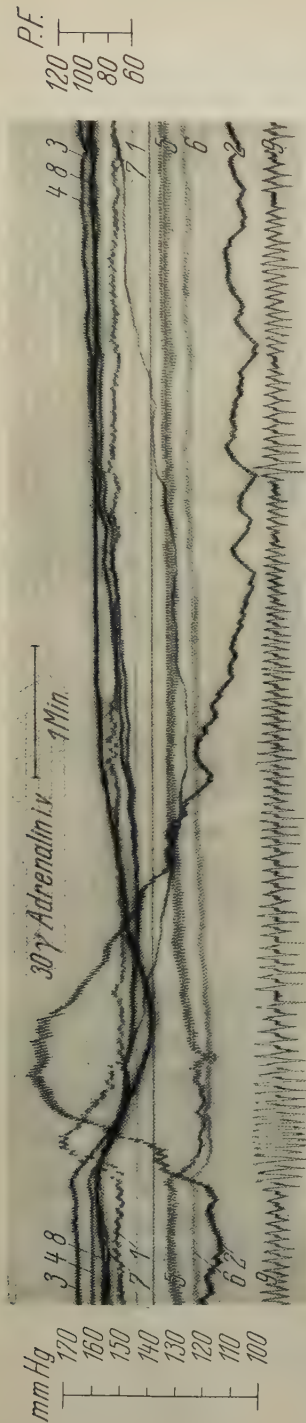


Abb. 4a—c. Intravenöse Injektion von 0,03 mg Adrenalin, 0,5 mg DHO 180, 0,03 mg Adrenalin. *1* Pulsfrequenz; *2* systolischer Druck; *3* Ohrdurchleuchtung ultrarot; *4* Ohrdurchleuchtung rot; *5* Fingerdurchleuchtung ultrarot; *6* Fingerdurchleuchtung rot; *7* Ohrtemperatur; *8* Fingertemperatur; *9* Atmung.

Fingervolumen und Fingertemperatur unverändert, während sich am Ohr die übliche Volumenzunahme zeigt. Die Pulsfrequenz nimmt nach DHO 180 viermal deutlich ab, einmal bleibt sie unverändert. Der Blutdruck zeigt nur einmal einen stärkeren Abfall von 25 mm Hg, zweimal ist der Abfall geringer, und zweimal ist der Blutdruck um ein geringes angestiegen. Die Adrenalinwirkung ist nach DHO 180 zweimal völlig unverändert, in 3 Versuchen ist die Adrenalinwirkung nach DHO 180 stärker als vorher. Besonders auffallend ist die deutlich erkennbare Vasokonstriktion am Finger nach DHO 180. Auch die Blutdruckmaxima liegen 10—25 mm Hg über denjenigen vor DHO 180.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß DHO 180 bei den gleichen normalen Versuchspersonen eine sehr viel stärkere Erweiterung der peripheren Gefäße zeigt als DHE 45. Während sich bei DHE 45 noch sehr häufig die bei Gynergen regelmäßig zu beobachtende periphere Vasokonstriktion findet, ist diese bei DHO 180 nicht mehr nachweisbar. Der Blutdruck zeigt überwiegend eine Tendenz zum Abfall und die Pulsfrequenz eine Abnahme. Eine Abschwächung der Wirkung von intravenös injiziertem Adrenalin läßt sich beim Gesunden nach DHO 180 ebensowenig nachweisen wie nach DHE 45 oder nach Ergotamin. Es scheint eher eine fördernde Wirkung in Frage zu kommen, die wahrscheinlich durch die Veränderung der Ausgangslage bedingt ist.

Die Abb. 4 zeigt einen Versuch bei Gabe von Adrenalin vor und nach Injektion von DHO 180.

In orientierenden Versuchen wurde DHO 180 an Hypertonikern untersucht. Bei 4 Patienten, bei denen klinisch eine maligne Sklerose vorlag, mit systolischen Blutdruckwerten über 200 und diastolischen über 100 mm Hg wurde 0,125—0,25 mg DHO 180 intravenös injiziert. Schon nach 0,125 mg wurde bei einem Patienten eine 30 Min. lang registrierte Senkung des systolischen Blutdrucks um 40 mm Hg beobachtet. Dabei war das Ohrvolumen nur wenig verändert, desgleichen die Herzfrequenz. Dieser Patient erhielt keine zweite Injektion von 0,25 mg DHO 180. Die drei anderen Patienten zeigten bei dieser geringen Dosis nur vorübergehende oder bleibende Blutdrucksenkungen von 10—15 mm Hg. Die Pulsfrequenz nahm in allen Fällen um 3 bis 10 Schläge je Minute ab, das Ohrvolumen zeigte einmal eine deutliche Zunahme, zweimal blieb es unverändert. Am Finger fand sich einmal eine deutliche Volumenzunahme mit Temperaturanstieg, einmal war das Volumen unverändert und einmal nicht zu beurteilen. Nach 0,25 mg DHO 180 wurde zweimal eine deutliche und anhaltende Blutdrucksenkung (40 und 15 mm Hg) beobachtet, einmal blieb der Blutdruck unverändert. Eine Bradykardie war in allen Fällen nachweisbar, in 2 Fällen wurde an Ohr und Finger eine deutliche Volumenzunahme beobachtet, bei einem dritten Patienten war diese am Finger nachweisbar.

d) Dihydroergocryptin 0,1, Dihydroergocornin 0,1, Dihydroergocristin 0,1 (CCK 179, 1 cm^3 = 0,3 mg): Bei 8 Versuchspersonen wurden verschiedene Dosen von CCK 179 verabfolgt, und zwar wurde bei 6 Versuchspersonen 1,25—1,75 cm^3 CCK 179 gegeben. In allen Versuchen sehen wir übereinstimmend wie bei DHO 180 eine Volumenzunahme an Ohr und Finger mit teilweiser Zunahme der Sauerstoffsättigung. Bereits nach 0,75 cm^3 CCK 179 tritt eine deutliche Vasodilatation an Ohr und Finger auf, die bei höherer Dosierung von 1,75 cm^3 CCK 179 noch ausgeprägter ist. Die Temperaturen an Ohr und Finger nehmen in allen Versuchen zu.

Der Blutdruck zeigt ein wechselndes Verhalten. Bei 4 Versuchspersonen finden wir einen anhaltenden, protrahierten geringen Blutdruckabfall um 10—15 mm Hg, während bei den restlichen 4 Versuchspersonen der Blutdruck unverändert bleibt. Die Pulsfrequenz wird nicht beeinflußt, wir finden keine Herabsetzung wie nach DHO 180, desgleichen wird die Atmung in Tiefe und Frequenz nicht verändert.

Zum Nachweis der sympathikolytischen Wirkung wurde bei einer Versuchsperson vor und nach Gabe von 2 cm^3 CCK 179 0,025 mg Adrenalin verabfolgt. Auch hierbei wurde, wie bei den übrigen Mutterkornalkaloiden keine Abschwächung oder Umkehr der Kreislaufreaktion bei der zweiten Adrenalininjektion beobachtet.

Besprechung der Ergebnisse. Unsere Untersuchungen am Menschen bestätigen hinsichtlich des Wirkungsbildes der untersuchten Mutter-

kornalkaloide weitgehend die tierexperimentellen Befunde Rothlins. Beim DHO 180 ebenso wie beim CCK 179 ist die periphere Vasodilatation und Mehrblutung, sowie die Neigung zu Blutdrucksenkung und Bradykardie deutlich ausgeprägt, Eigenschaften, die man auf Grund der tierexperimentellen Befunde geneigt ist, mit der sympathikolytischen Wirkung dieser Substanzen in Zusammenhang zu bringen. Beim DHE 45 und noch mehr beim Ergotamin überwiegen gefäßverengernde und blutdrucksteigernde Eigenschaften, die mit der direkten Wirkung dieser Substanzen auf die glatte Gefäßmuskulatur erklärt werden können. Bemerkenswert ist, daß sich nach keiner dieser Substanzen eine Abschwächung oder Umkehr der Adrenalinwirkung nachweisen läßt, obwohl die oben genannten, meist auf die Sympathikolyse zurückgeführten Wirkungen mindestens bei DHO 180 und CCK 179 deutlich nachweisbar sind. Die Adrenalinwirkung, und zwar nicht nur die Blutdrucksteigerung, sondern auch die periphere Wirkung des Adrenalins auf Hautvolumen, Sauerstoffsättigung des Blutes und Hauttemperatur, ebenso wie die Wirkung auf die Pulsfrequenz und die Atmung erscheint nach diesen Substanzen eher verstärkt, keinesfalls aber abgeschwächt oder umgekehrt. Nach Rothlin haben besonders die dihydrogenierten Alkaloide neben dem peripheren sympathikolytischen noch einen zentralen Angriffspunkt. Der Vergleich der Wirkung an der Spinalkatze mit derjenigen am narkotisierten unversehrten Tier spricht dafür, daß Blutdrucksenkung und Bradykardie auf eine Wirkung der Substanzen auf das Vasomotorenzentrum zurückzuführen sind. In Bestätigung dieser Auffassungen sprechen auch unsere Untersuchungen dafür, daß die besonders nach DHO 180 und CCK 179 auftretenden Wirkungen (Blutdrucksenkung, Bradykardie, periphere Vasodilatation) auf einen zentralen Angriff dieser Substanzen und nicht auf eine periphere sympathikolytische Wirkung zurückzuführen sind. Unsere Untersuchungen am Menschen wurden durch die Untersuchungen von Ther und Wezler bestätigt, die am nicht narkotisierten Karotisschlingenhund ebenfalls keine Abschwächung, sondern eine Verstärkung der Adrenalinwirkung durch Ergotamin und DHE 45 beobachteten.

Die Tatsache, daß Adrenalin und Sympatol nach den Mutterkornalkaloiden eher verstärkt wirken, läßt sich durch die Verschiebung der Ausgangslage in einem, der sympathikomimetischen Wirkung gegensätzlichen Sinne verstehen, spricht jedoch gegen eine Konkurrenz dieser Substanzen an nur einem peripheren Angriffsort.

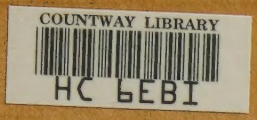
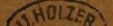
Zusammenfassung.

An normalen Versuchspersonen wird das Wirkungsbild der Mutterkornalkaloide Gynergen, DHE 45, DHO 180 und des Kombinationspräparates CCK 179 beschrieben. Beim Gynergen finden wir deutliche

Vasokonstriktion an Ohr und Finger mit Blutdrucksteigerung. Nach DHE 45 beobachten wir eine Abschwächung dieser vasokonstriktorischen Wirkungen. Am Finger tritt ausschließlich eine Volumenzunahme mit Zunahme der Sauerstoffsättigung auf, während am Ohr in allen Versuchen eine geringe Vasokonstriktion auftritt. Der Blutdruck zeigt eine anhaltende geringe Erhöhung, nur in einem Versuch wird ein anhaltender Bludruckabfall beobachtet. Nach DHO 180 sehen wir keine Vasokonstriktion, sowohl am Ohr als auch am Finger tritt Vasodilatation mit verschieden starker Zunahme der Sauerstoffsättigung des Kapillarblutes auf. Der Blutdruck fällt in der Mehrzahl der Versuche um 10 bis 20 mm Hg ab. Das Kombinationspräparat CCK 179 ähnelt in seinem Wirkungsbild weitgehend dem DHO 180.

Zum Nachweis der sympathikolytischen Wirkung dieser Stoffe wurden vor Injektion der Mutterkornalkaloide und danach kleine Adrenalindosen verabfolgt. Wir sahen niemals eine Abschwächung oder Umkehr der Adrenalinwirkung, sondern beobachteten im Gegenteil eher eine Verstärkung der Kreislaufreaktion nach der zweiten Adrenalininjektion. Dieser Befund berechtigt zu der Annahme, daß die Kreislaufwirkungen besonders von DHO 180 und CCK 179 nicht auf eine periphere Sympathikolyse, sondern auf einen zentralen Angriffspunkt dieser Alkaloide zurückzuführen sind.

Literatur.

[1] Stoll, A., u. A. Hofmann: Helvet. chim. Acta **26**, 1570, 1502. 2070 (1943). — [2] Rothlin, E.: Helvet. physiol. Acta C **2**, 48 (1944). — [3] Rothlin, E.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1254. — [4] Rothlin, E.: Bull. Acad. Suisse Sci. Med. **2**, H. 4 (1946/47). — [5] Rothlin, E.: Bull Acad. Suisse Sci. Med. **1**, H. 3 (1945). — [6] Nordenfelt, O.: Acta med. scand. (Schwed.) Suppl. **119** (1941). — [7] Leitner, J.: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 1349. — [8] Spühler, O.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 28. — [9] Spühler, O.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1259. — [10] Ott, V. R.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 648. — [11] Steinmann, Lüdi u. Barben: Helvet. med. Acta **15**, 76 (1948). — [12] Euler, U. S. v., u. C. M. Hesser: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 20. — [13] Bluntschli, H. J., u. R. H. Götz: Schweiz. med. Wschr. **1945**, 769. — [14] Horton, B. T., G. A. Peters u. L. S. Blumenthal: Stollsche Festschrift, S. 355. Basel: Benno Schwabe 1947. — [15] Lennox: Stollsche Festschrift, S. 363. Basel: Benno Schwabe 1947. — [16] Birkhäuser, R.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 102. — [17] Lenggenhager, K.: Stollsche Festschrift, S. 318. Basel: Benno Schwabe 1947. — [18] Imfeld, I. P.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1263. — [19] Pritzker, B.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 985. — [20] Matthes, K.: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 28. — [21] Wezler, K.: Dtsch. Physiologen-Kongr. 1948.

41B212